

Aus dem Institut für Neuroimmunologie
der Medizinischen Fakultät der Charité -
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Bedeutung löslicher TNF- Familienmitglieder für die Multiple Sklerose

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité -
Universitätsmedizin Berlin

von
Stefan Ehrlich
aus Halle/Saale

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. F. Zipp
 2. Prof. Dr. med. N. Sommer
 3. Prof. Dr. med. N. Goebels

Datum der Promotion: 29. Mai 2006

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	6
1.1. Apoptose.....	6
1.1.1. Geschichte und Definition.....	6
1.1.2. Rezeptor-vermittelte Apoptosesysteme.....	7
1.1.3. Das CD95-Rezeptor/CD95-Ligand-System	8
1.1.4. Das TRAIL-Rezeptor/TRAIL-System	10
1.2. Die Multiple Sklerose.....	12
1.2.1. Definition, Symptome und Diagnose der MS.....	12
1.2.2. Verlauf und Prognose der MS	13
1.2.3. Epidemiologie und Ätiologie der MS.....	14
1.2.4. Pathologie und Pathogenese der MS	16
1.2.5. Therapie der MS.....	17
1.3. Die Bedeutung der Apoptose in der Pathogenese der MS	19
1.3.1. Bedeutung des CD95 Signalweges.....	21
1.3.2. Bedeutung des TRAIL Signalweges.....	23
1.4. Fragestellung	24
2. MATERIALIEN UND METHODEN	28
2.1. Patientenkollektiv und gesunde Kontrollen – Gewinnung der Proben	28
2.2. Zellisolation.....	28
2.2.1. Separation peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC)	28
2.2.2. Kryokonservierung peripherer mononukleärer Blutzellen	29
2.2.3. Auftauen der kryokonservierten peripheren mononukleären Blutzellen	30
2.2.4. Magnetische Zelltrennung (MACS)	30
2.3. Zellkultur	32
2.3.1. PBMC.....	32
2.3.2. PBMC-Subgruppen	32
2.3.3. Humane antigenspezifische T-Zelllinien.....	33
2.3.4. Transformierte Zellen.....	34
2.4. ELISA.....	34
2.4.1. Allgemeines Prinzip	34
2.4.2. Die Bestimmung von sTRAIL in Zellkulturüberständen	35

2.4.3.	Die Bestimmung von IFN- γ in Zellkulturüberständen	35
2.4.4.	Die Bestimmung von IL-4 in Zellkulturüberständen.....	36
2.4.5.	Die Bestimmung von sCD95 im Zellkulturüberstand oder Serum.....	36
2.5.	Durchflusszytometrie.....	37
2.5.1.	Allgemeine Prinzipien.....	37
2.5.2.	Voreinstellungen des Gerätes	38
2.5.3.	Färbung und Kontrollen	38
2.5.4.	Die Bestimmung der Reinheit der magnetisch separierten Zellen.....	40
2.5.5.	Die Bestimmung der TRAIL-Expression auf PBMC-Subgruppen	41
2.5.6.	Die Auswertung der erhobenen Daten.....	42
2.6.	Zelltodnachweise	42
2.6.1.	Prinzipien	42
2.6.2.	Trypanblaufärbung.....	43
2.6.3.	Propidiumiodidfärbung	43
2.6.4.	DNA-Fragmentierung nach Nicoletti	43
2.7.	Proliferationsnachweise	44
2.8.	Statistische Auswertung.....	45
2.9.	Verwendete Materialien	46
2.9.1.	Zellkulturmedien und Puffer	46
2.9.2.	Substanzen für die PBMC und T-Zellkultur.....	46
2.9.3.	Substanzen für Magnetische Zelltrennung (MACS)	47
2.9.4.	Substanzen für die Durchflusszytometrie.....	47
2.9.5.	Substanzen zum Nachweis von Zelltod.....	48
2.9.6.	Verwendete Geräte.....	48
2.9.7.	Verbrauchsmaterialien.....	48
2.9.8.	Verwendete Software	49
3.	ERGEBNISSE.....	50
3.1.	Die Expression und Regulation von TRAIL	50
3.1.1.	Vorexperimente - Lösliches TRAIL im Zellkulturüberstand von stimulierten PBMC	50
3.1.2.	Regulation durch zellspezifische Stimuli	52
3.1.2.1	Lösliches TRAIL	52
3.1.2.2	Membranständiges TRAIL	55
3.1.3.	Regulation durch IFN- β	57
3.1.3.1	Lösliches TRAIL	57
3.1.3.2	Membranständiges TRAIL	58

3.1.4.	TRAIL-Sekretion, Zellproliferation und absolute Zellzahlen	60
3.1.5.	Die biologische Aktivität von sTRAIL aus Zellkulturüberständen	61
3.2.	Immunomodulatorische Wirkungen von TRAIL.....	63
3.2.1.	Expression von löslichem oder membranständigem TRAIL im Vergleich zwischen MS-Patienten und gesunden Probanden	63
3.2.2.	Der Effekt von TRAIL auf die Proliferation von antigenspezifischen T-Zelllinien	64
3.2.3.	Der Effekt von TRAIL auf die Sekretion von INF- γ und IL-4 durch antigenspezifische T-Zelllinien	65
3.3.	Die Expression und Regulation von löslichem CD95	65
3.3.1.	Die Etablierung der Messmethode	66
3.3.2.	Bestimmung von sCD95 im Überstand von PBMC	68
3.3.3.	Bestimmung von sCD95 im Überstand von aktivierten T-Zellen, B-Zellen und Monozyten	71
3.3.4.	Bestimmung von sCD95 im Überstand von T-Zelllinien	72
3.4.	Mögliche immunomodulatorische Wirkung von sCD95.....	73
3.4.1.	Expression von sCD95 im Vergleich zwischen MS-Patienten und gesunden Probanden	73
3.4.2.	Longitudinale Studie von sCD95-Serumkonzentrationen bei schwangeren MS-Patientinnen	74
4.	DISKUSSION.....	79
4.1.	Expression, Regulation und mögliche Bedeutung von TRAIL	80
4.2.	Die Expression, Regulation und mögliche Bedeutung von sCD95	88
4.3.	Ausblick	92
5.	ZUSAMMENFASSUNG	94
6.	LITERATURVERZEICHNIS	96
7.	APPENDIX.....	108
7.1.	Verzeichnis häufig benutzter Abkürzungen	108
7.2.	Danksagung	110
7.3.	Erklärung.....	111
7.4.	Publikationen.....	112

1. Einleitung

Das Thema der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der Regulation zweier Apoptosesysteme, TRAIL und CD95/CD95Ligand, und deren mögliche Bedeutung für die Entstehung und Aufrechterhaltung von Autoimmunprozessen im Rahmen der Multiplen Sklerose (MS). Der Schwerpunkt liegt dabei auf der Rolle der löslichen Proteine sTRAIL und sCD95. Im Folgenden werden zunächst die verschiedenen Apoptosesysteme, das Krankheitsbild der MS und die Rolle von Apoptoseprozessen in der Pathogenese der MS erörtert.

1.1. Apoptose

1.1.1. Geschichte und Definition

Die Bezeichnung Apoptose kommt vom altgriechischen Wort *αποπτóσις*, welches sich mit „Fallen der Blütenblätter von einer Blume“ oder „Fallen der Blätter von einem Baum im Herbst“ übersetzen lässt. Der Begriff wurde 1972 von John Kerr als morphologische Beschreibung für die Formation von „apoptotic bodies“ durch sterbende Zellen geprägt (Kerr et al., 1972). Das Phänomen selbst wurde 1842 erstmals von Carl Vogt beschrieben. Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltods, gekennzeichnet durch eine festgelegte Abfolge von biochemischen und physikalischen Veränderungen, die nahezu alle Zellbestandteile betreffen: Zunächst schrumpft die Zelle und verliert den Kontakt zu anderen Zellen. Dann schwillt das Endoplasmatische Retikulum an, und Vesikel werden gebildet. Später fragmentieren DNAsen die Desoxyribonukleinsäure (DNA), und das Kernchromatin erscheint verdichtet. Letztlich zerfallen Zelle und Zellkern in verschiedene membranumschlossene „apoptotic bodies“ mit fragmentierten Zellorganellen. Unter physiologischen Umständen werden diese nun aufgrund von Zellmembranmodifikationen von Phagozyten erkannt und ohne die Induktion eines Entzündungsprozesses entfernt (Kerr et al., 1994). Hier liegt einer der Hauptunterschiede zum Prozess der Onkose bzw. Nekrose (siehe auch Tabelle 1), bei dem die Zelle in einer ungeordneten Art und Weise anschwillt und unter Zerstörung der Zellorganellen durch die Ruptur der Plasmamembran auslaufen kann, so dass Pathogene gegebenenfalls weiter verbreitet werden (Trump et al., 1997).

Kennzeichen	Nekrose	Apoptose
Stimuli	<ul style="list-style-type: none"> • Toxine • Schwere Hypoxie • Massiver Insult • ATP-Mangelzustände 	<ul style="list-style-type: none"> • Induktion über spezifische Todesrezeptor/-ligandensysteme • Entzug von Wachstumsfaktoren/ Bestrahlung • Physiologische und pathologische Zustände ohne ATP Mangel
Energieerfordernis	<ul style="list-style-type: none"> • Keine 	<ul style="list-style-type: none"> • ATP-abhängig
Gewebereaktion	<ul style="list-style-type: none"> • Entzündung 	<ul style="list-style-type: none"> • Keine Entzündung
Histologie	<ul style="list-style-type: none"> • Zellschwellung • Platzen von Organellen • Tod konjunkter Gewebebezirke 	<ul style="list-style-type: none"> • Zellschrumpfung und Chromatinkondensation • Apoptotische Körperchen • Tod von einzelnen, isolierten Zellen
Plasmamembran	<ul style="list-style-type: none"> • Lysiert 	<ul style="list-style-type: none"> • Intakt
DNA-Muster	<ul style="list-style-type: none"> • Zufällige Fragmentgröße 	<ul style="list-style-type: none"> • Strickleiterähnliche Fragmentmuster • Regelmäßige Größenverteilung der Fragmente

Tabelle 1: Kardinale Kenzeichen von Nekrose und Apoptose (adaptiert nach Aktas, 2000)

Die Apoptose ist ein essentieller Prozess für die Gewebshomöostase vor allem während der Embryonalentwicklung. Um geordnetes Wachstum und Entwicklung zu garantieren, ist eine Balance zwischen Zellproliferation und -differenzierung sowie programmiertem Zelluntergang notwendig (Melino, 2001).

Die Hypothese, dass einige Krankheiten durch zuviel (Morbus Parkinson, Alzheimer, Spinale Muskelatrophie, AIDS) oder zu wenig (Krebs, Autoimmunkrankheiten) Apoptose gekennzeichnet sind, hat das wissenschaftliches Interesse an Apoptose zusätzlich gesteigert (Strasser et al., 2000).

1.1.2. Rezeptor-vermittelte Apoptosesysteme

Es gibt zwei grundsätzlich verschiedene Mechanismen, die Apoptose induzieren können: den intrinsischen oder mitochondrialen Mechanismus und den extrinsischen

Mechanismus. Für die Auslösung des intrinsischen Mechanismus spielen intrazelluläre Stressoren wie zytotoxische Agenzien oder oxidativer Stress eine wichtige Rolle. Der extrinsische Weg wird durch die Bindung von Liganden an membranständige Rezeptoren ausgelöst. Beide Signalkaskaden konvergieren auf der Ebene spezifischer Proteasen - der Caspasen, deren aktive Formen Zellorganellen und DNA spalten können (Strasser et al., 2000). Außerdem spielt die relative Expression von pro- oder anti-apoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie (B-cell lymphoma-2 Protein) eine zentrale Rolle bei der Induktion von Apoptose. Diese Proteine können in ihrer Dimer-Form durch Porenbildung in Mitochondrien Apoptose vermitteln (Borner, 2003).

In dieser Arbeit liegt der Schwerpunkt auf der Regulation der rezeptorvermittelten Apoptose durch lösliche Faktoren, also dem extrinsischen Mechanismus: Membranständige Rezeptoren werden durch extrazelluläre Liganden aktiviert. Viele dieser Rezeptoren gehören zur Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-Familie (TNF-R-Familie) und sind Typ-I-transmembranöse Proteine, deren zysteinreiche extrazelluläre Domäne für Rezeptor-Liganden-Interaktionen und Komplexbildung aus mehreren Rezeptoren verantwortlich ist (Chan et al., 2000). Das intrazelluläre Ende der Rezeptoren enthält eine zytosolische „Todesdomäne“ (death domain, abgekürzt DD) aus ca. 80 Aminosäuren, die innerhalb von Sekunden Apoptose auslösen kann. Die DD rekrutiert die Caspasen (Zystein-Proteasen, die Proteine nach einem Aspartat-Rest schneiden) 8 und 10, welche dann ihrerseits den „Zelltod-induzierenden Signalkomplex“ (death inducing signaling complex, DISC) aktivieren. Am Ende der Signalkaskade steht die Aktivierung der oben beschriebenen Effektor-Caspasen (Strasser et al., 2000). Während der TNF-Signalweg bereits sehr intensiv studiert wurde, ist die Bedeutung des CD95- und des TRAIL-Signalwegs noch nicht ganz verstanden.

1.1.3. Das CD95-Rezeptor/CD95-Ligand-System

CD95 (auch Fas oder APO-1 genannt) und TNF-R-1 sind zwei typische und relativ früh entdeckte Vertreter der Apoptose-vermittelnden Todesrezeptoren. In der CD95-Signalkaskade kann Apoptose ausgelöst werden, indem der CD95-Ligand (CD95L) an CD95 bindet, welches daraufhin trimerisiert. Adapterproteine, hier das „Fas-assoziierte Todesdomänen-Protein“ (Fas-associated death domain protein, FADD) binden dann durch elektrostatische Interaktionen an die zytosolische DD von CD95. FADD enthält eine Todeseffektordomäne (death effector domain, DED), an welche Pro-Caspase 8 binden kann. Dieser gebildete Komplex wird dann, wie bereits beschrieben, DISC

genannt (Ashkenazi, 2002).

TNF-R-1 dagegen hat die besondere Fähigkeit, sowohl Proliferation bei Entzündungsreaktionen, als auch Apoptose auslösen zu können. Welches Signal vermittelt wird hängt davon ab, welche Moleküle in der Zelle für den Aufbau des DISC vorhanden sind. Die Rekrutierung von FADD führt zur Apoptose, während die Rekrutierung von RIP1 (receptor interacting protein 1) oder TRAF (tumor necrosis factor receptor-associated factor) zu anti-apoptotischen Effekten führt (Ashkenazi, 2002). Dies zeigt, dass die TNF-R-Familie über Signalkaskaden von einem breiten Wirkungsspektrum verfügt, angefangen von Apoptose bis hin zu Proliferation. Zusätzliche Komplexität entsteht durch Interaktionen der Liganden mit löslichen Rezeptoren (MacEwan, 2002).

CD95 wird in verschiedenen Geweben exprimiert, vor allem aber im Thymus, der Leber und in den Nieren. CD95L dagegen wurde fast ausschließlich auf aktivierten T-Zellen und Natural-Killer-Zellen (NK-Zellen) gefunden (Suda et al., 1993). Das Typ-II-transmembranöse CD95L-Protein ist verantwortlich für drei verschiedene Prozesse, die Apoptose involvieren: die Elimination von (a) CD95 exprimierenden Targetzellen durch zytotoxische T-Zellen, (b) von Entzündungszellen in immunprivilegierten Geweben und von zytotoxischen T-Zellen durch Tumorzellen und (c) der CD95L exprimierenden T-Zelle selbst im Sinne einer autokrinen Schleife, bei der nach T-Zellaktivierung abgegebenes lösliches CD95L auf T-Zell-eigene CD95-Rezeptoren wirkt, oder als „Fratricide“ durch eine weitere T-Zelle. Dieser Prozess wird auch „aktivierungsinduzierter Zelltod“ genannt (activation-induced cell death, AICD). AICD betrifft reife proliferierende T-Zellen, beinhaltet in der Regel eine erneute Aktivierung der T-Zelle über den T-Zell-Rezeptor (Nagata, 1997), ist meist CD95-vermittelt und dient der Beendigung einer Immunantwort. Ko-stimulatorische Signale einer professionellen antigenpräsentierenden Zelle (APC), z.B. das Binden von B7 an den CD28-Rezeptor der T-Zelle, können diesen Prozess verhindern (Krueger et al., 2003). Der CD95-unabhängige AICD spielt darüber hinaus eine zentrale Rolle bei der negativen Selektion von Thymozyten im Thymus.

Wie bereits beschrieben, ist die CD95-vermittelte Apoptose abhängig von der Expression von membranständigem oder löslichem CD95L. Doch gibt es im weiteren Verlauf der Signalkaskade eine ganze Reihe zusätzlicher Regulationsmechanismen: So können die Proteine FLIP_S und FLIP_L (FADD-like IL-1 β -converting enzyme inhibitory proteins) mit der DED von FADD assoziieren, bzw. kann FLIP_L die Procaspase 8

deaktivieren und somit die Signalkaskade unterbrechen (Irmeler et al., 1997). Außerdem kann eine lösliche Form des CD95-Rezeptors (sCD95) in der extrazellulären Flüssigkeit CD95L beziehungsweise Antikörper gegen CD95 binden, ohne dass ein Apoptosesignal weitergeleitet wird (Cheng et al., 1994). Das Gen für den CD95-Rezeptor liegt auf Chromosom 10 und besteht aus neun Exonen. Der lösliche CD95-Rezeptor entsteht durch „alternative splicing“ der Exone drei, vier und sechs der regulären CD95-mRNA (Messenger-Ribonukleinsäure). Dabei entstehen mindestens fünf unterschiedliche Varianten (FasExo6Del, FasExo4Del, FasExo4,6Del, FasExo3,4Del, FasExo3,4,6Del), die um jeweils ein oder mehrere Exone verkürzt sind (Papoff et al., 1996). Zusätzlich kommt es bei FasExo3,4Del, FasExo3,4,6Del zur Verschiebung des Leserasters (frame shift). Keine der Varianten besitzt eine DD, wobei FasExo6Del im transmembranösen Bereich, alle anderen Varianten in der extrazytoplasmatischen Region abgeschnitten sind.

Kulturüberstände von Zellen, die mit einer dieser Varianten der mRNA oder abgeschnittener zytosolischen DNA transfiziert wurden, konnten die CD95L-vermittelte Apoptose blockieren (Cascino et al., 1995; Liu et al., 1995). Mäuse denen lösliches sCD95 injiziert wurde zeigten Autoimmunphänomene (Cheng et al., 1994). Für die Blockade der CD95L-vermittelten Apoptose sind die ersten 49 Aminosäuren der N-terminalen Domäne der sCD95-Varianten verantwortlich. Diese binden an CD95L bzw. können wahrscheinlich auch Trimere mit funktionellen CD95-Rezeptoren bilden und somit eine Signaltransduktion verhindern, für die eine Trimer-Bildung aus drei vollständigen CD95-Rezeptoren nötig ist (Papoff et al., 1996).

Eine dem sCD95 ähnliche Funktion hat der lösliche decoy receptor 3 (englisch für Köder-Rezeptor, abgekürzt DcR) (Pitti et al., 1998). Einige dieser Regulationsmechanismen werden von Tumorzellen genutzt, um einer Immunantwort zu entgehen. Auch bei Autoimmunkrankheiten könnten sie eine Rolle spielen (Cheng et al., 1994; Pitti et al., 1998).

1.1.4. Das TRAIL-Rezeptor/TRAIL-System

Obwohl CD95 der zuerst entdeckte und am besten charakterisierte Todesrezeptor (death receptor, DR) ist, gibt es viele andere Mitglieder der TNF-Rezeptor Familie mit weitreichender Aminosäuren-Sequenz-Homologie. So besitzen DR4, DR5, CAR1, p75 und der bereits beschriebene TNF-R1 auch eine DD. DR4 und 5 werden durch das Binden des TNF-verwandten apoptoseinduzierenden Liganden (TNF-related Apoptosis-

Inducing Ligand, kurz TRAIL, auch als APO2-Ligand bezeichnet), einem Typ II-Membranprotein, aktiviert, woraufhin sie trimerisieren und Apoptose auslösen (Ashkenazi, 2002; Pitti et al., 1996). Die durch DR4 und DR5 ausgelöste Signalkaskade hat große Ähnlichkeiten mit der von CD95 ausgelösten Signalkaskade. So ist sowohl FADD als auch Caspase 8 ein essentieller Bestandteil des TRAIL-DISC (Bodmer et al., 2000). TRAIL bindet spezifisch an DR4 und DR5, aber zusätzlich auch an die beiden Köder-Rezeptoren DcR1 und DcR2, die keine (DcR1), oder nur eine unvollständige DD (DcR2) besitzen. Weiterhin existiert ein löslicher Rezeptor, Osteoprotegerin, der, wenn auch mit niedrigerer Affinität, an TRAIL binden und durch kompetitive Inhibition der TRAIL-TRAIL-Rezeptor Interaktion die Apoptose blockieren kann (Emery et al., 1998). Obwohl diverse humane Gewebe TRAIL-Rezeptoren exprimieren, wurde zunächst von einer selektiven toxischen Wirkung von TRAIL auf transformierte bzw. Tumorzellen berichtet. Diese Selektivität wurde mit unterschiedlichen Expressionsprofilen der DcR mit anti-apoptotischer Wirkung in Zusammenhang gebracht, was Hoffnungen auf eine therapeutische Anwendung von TRAIL schürte (Ashkenazi et al., 1999). Experimentelle Überexpression der DcR hatte eine Apoptose-inhibierende Wirkung gezeigt (Pan et al., 1997; Sheridan et al., 1997). Studien mit spezifischen Antikörpern gegen die unterschiedlichen TRAIL-Rezeptoren konnten jedoch keine Korrelation zwischen TRAIL-Resistenz von Zelllinien und DcR-Expression herstellen (Walczak und Krammer, 2000). Neuere Studien haben die Hoffnung auf eine direkte klinische Anwendbarkeit weiter reduziert. So konnte nachgewiesen werden, dass TRAIL in menschlichen Hepatozyten und Gehirnzellen Apoptose von erheblichem Ausmaß verursachen kann (Jo et al., 2000; Nitsch et al., 2000). Dennoch wurde in Tierversuchen gezeigt, dass die systemische TRAIL-Administration ohne schwerwiegende toxische Nebenwirkungen das Tumorstadium stoppen kann. Verglichen mit CD95L und TNF, die im Tierversuch beide stark toxisch wirken, handelt es sich um ein sehr interessantes Ergebnis, welches allerdings die Interpretation der bisherigen Kenntnisse über das TRAIL-System nicht einfacher macht (Walczak und Krammer, 2000).

Eine Lösung des komplexen Zusammenhangs könnte auf der Ebene von intrazellulären Proteinen oder Transkriptionsfaktoren zu suchen sein, die anti-apoptotische Gene regulieren. TRAIL induziert sowohl den Transkriptionsfaktor NF- κ B als auch die Jun N-terminale Kinase (JNK), die an der Bildung des Transkriptionsfaktors AP-1 beteiligt ist (MacFarlane et al., 2000). Zudem ist die TRAIL-Sensitivität invers mit der Expressionsstärke des bereits oben erwähnten FLIP korreliert, es besteht jedoch kein

Zusammenhang mit der Überexpression von Bcl-2 oder Bcl-XL (Walczak et al., 2000). TRAIL als Ligand kommt auf der Zelloberfläche aber auch in Körperflüssigkeiten vor. Für die Bildung der als lösliches TRAIL (sTRAIL) bezeichneten Form sind zwei Mechanismen beschrieben worden. Mariani und Krammer zeigten, dass sTRAIL durch Zystein-Proteasen aus membranständigem TRAIL auf der Zelloberfläche von humanen transformierten T- und B-Zellen entsteht (Mariani und Krammer, 1998). Martinez-Lorenzo et al. beschrieben die rasche Abgabe von TRAIL in präformierten Mikrovesikeln aus stimulierten Jurkat T-Lymphomzellen, peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) und T-Zell-Blasten (Martinez Lorenzo et al., 1999).

1.2. Die Multiple Sklerose

1.2.1. Definition, Symptome und Diagnose der MS

Multiple Sklerose (MS), auch Encephalomyelitis disseminata genannt, ist eine chronische Erkrankung des Zentralen Nervensystems (ZNS) mit Beginn im jungen Erwachsenenalter. Morphologisch ist die MS durch perivaskuläre Entzündungsherde in der weißen Substanz gekennzeichnet, die zu Demyelinisierung und Axonschäden führen. Charakteristischerweise handelt es sich dabei um disseminiert auftretende Läsionen, d.h. sie sind an verschiedenen Stellen des Gehirns und zu verschiedenen Zeiten zu finden (Schmidt und Hoffmann, 2002).

Da die Läsionen in diversen Teilen des ZNS auftreten, kommt es zu vielfältigen Beeinträchtigungen. Die folgenden Symptome treten bei über 10% der Neuerkrankten und über 50% der chronisch Kranken auf: Fatigue, Neuritis opticus, Internukleäre Ophthalmoplegie, Nystagmus, Vertigo, Gangstörungen, Sensibilitätsverlust, verstärkte Muskeleigenreflexe, Spastizität und Miktionsstörungen.

Die Diagnose der MS erweist sich oftmals als schwierig, da einzelne Symptome und Tests nicht spezifisch genug sind, um als beweisend zu gelten. Zur Erleichterung der Diagnose wurden deshalb frühzeitig standardisierte Kriterien eingeführt (Poser et al., 1983). Aufgrund der zunehmenden Bedeutung bildgebender Verfahren in der Diagnostik wurden die Kriterien im Jahre 2001 vom „International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis“ überarbeitet (McDonald et al., 2001). Demnach müssen folgende Bedingungen erfüllt sein:

- 1) Es muss ein objektiver Nachweis (neurologische Untersuchung) von mindestens zwei Schüben erbracht werden, definiert als eine Verschlechterung von MS-typischen Symptomen, die mindestens 24h anhalten.
- 2) Die beiden Schübe müssen räumlich (Läsionen in unterschiedlichen Arealen des ZNS) und zeitlich (30 Tage) voneinander getrennt sein.
- 3) Alle anderen Erklärungen für die Symptome und Schübe des Patienten müssen ausgeschlossen werden.

Neben Anamnese und dem neurologischen Befund stützt sich die Diagnose auf folgende Untersuchungen:

- Liquordiagnostik (elektrophoretischer Nachweis einer Erhöhung des intrathekalen Immunglobulin G bei nur mäßiger lymphozytischer Pleozytose)
- Magnetresonanztomographie (Nachweis kontrastmittelanreichernder, multi-fokaler Läsionen in der weißen Substanz)
- Visuell evozierte Potentiale (Latenzverzögerungen)

1.2.2. Verlauf und Prognose der MS

Statistisch liegt das mittlere Alter zu Beginn der Erkrankung bei 30 Jahren, der Modalwert dagegen bei 23-24 Jahren. Ein Erkrankungsbeginn vor dem 15. oder nach dem 50. Lebensjahr ist selten (Vukusic und Confavreux, 2001). Man unterscheidet drei Haupttypen des MS-Krankheitsverlaufes (Abb. 1). Etwa 80-85% der Patienten haben zunächst einen (A) schubförmig remittierenden Verlauf (RRMS), der durch akute Schübe mit nachfolgender vollständiger oder partieller Genesung ohne Zustandsverschlechterung zwischen den Schüben gekennzeichnet ist. Nur 10-15% der Patienten leiden an (C) primär chronisch-progredienter MS (PPMS), die sich durch eine mehr oder weniger kontinuierliche Verschlechterung des Zustandes auszeichnet. Innerhalb von zehn Jahren nach Krankheitsbeginn entwickeln 50% der RRMS-Patienten

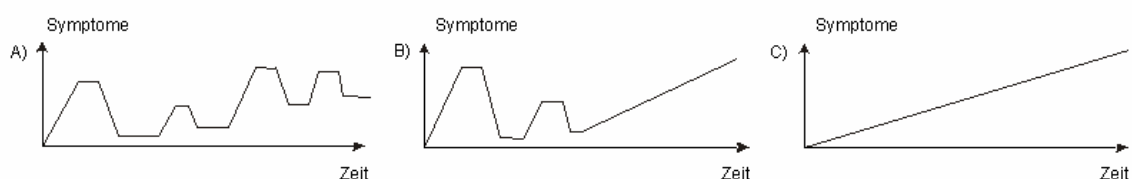


Abbildung 1: Verlaufsformen der MS

eine (B) sekundär chronisch-progrediente MS (SPMS) mit zunehmender Krankheitsverschlechterung auch zwischen den Schüben (Lublin und Reingold, 1996).

Die Frequenz der Schübe weist eine hohe Variabilität auf und liegt im Mittel bei 0.5 pro Patient und Jahr. Sie ist höher bei jüngeren Patienten und zu Krankheitsbeginn. Ebenso unterschiedlich ist der Zeitraum, nach dem es zu einer signifikanten dauerhaften körperlichen Behinderung kommt. Typischerweise ist das Laufen zehn Jahre nach Krankheitsbeginn deutlich eingeschränkt und die Lebenserwartung um 6-14 Jahre reduziert (Weinshenker und Ebers, 1987). Als prognostisch ungünstig gelten ein PPMS-Verlauf (Alter bei Krankheitsbeginn häufig > 40 Jahre), der frühe Beginn eines SPMS-Verlaufes, häufige Schübe mit inkompletter Remission, motorische, zerebelläre und die Sphinkter betreffende Störungen, sowie polyregionale Symptome. Patienten mit klinisch isolierten Symptomen (CIS), jedoch ohne definitive MS, entwickeln in 88% der Fälle eine klinisch gesicherte MS, wenn initial in T2-gewichteten Magnetresonanztomografie-Bildern (MRT) bereits Läsionen vorlagen (O'Riordan et al., 1998).

Der Suizid stellt neben anderen Komplikationen der MS eine ernstzunehmende Todesursache bei MS-Kranken dar, wobei bisher nicht geklärt werden konnte, ob ein ursächlicher Zusammenhang zu den Hirnläsionen besteht (Ehrlich et al., 2003; Ehrlich et al., 2004; Ehrlich et al., 2005).

Schwangerschaften haben einen positiven Effekt auf die klinische Symptomatik der MS und anderer T-Helferzell-vermittelter Autoimmunerkrankungen. Besonders im letzten Trimenon der Schwangerschaft ist die Rate der Krankheitsschübe signifikant erniedrigt, wogegen postpartum für ca. sechs Monate eine Zunahme der Krankheitsschübe im Vergleich zur Zeit vor der Schwangerschaft zu verzeichnen ist. Die genauen Ursachen für die protektive Wirkung von Schwangerschaften auf den Verlauf der MS sind nicht endgültig geklärt (Birk et al., 1990; Birk et al., 1988).

1.2.3. Epidemiologie und Ätiologie der MS

Die Prävalenz der MS in unterschiedlichen geographischen Regionen schwankt zwischen 1/100 000 und 100/100 000. Dabei ist die Verteilung komplex und nicht zufällig. Generell ist ein Anstieg der Krankheitsprävalenz mit den Breitengraden zu beobachten. So sind beispielsweise die nördlichen Vereinigten Staaten, Nord- und Zentraleuropa sowie Südastralien Hochrisikogebiete (>30/100 000), wogegen Teile Afrikas, Asiens und Südamerikas durch ein niedriges Risiko gekennzeichnet sind (<5/100 000). Außerdem ist mehrfach beschrieben worden, dass Immigranten, die vor

dem 14. Lebensjahr immigrieren, in der Regel eine ähnliche MS-Prävalenz wie die ortsansässige Bevölkerung entwickeln. Im Gegensatz dazu gibt es ethnische Gruppen, wie Schwarzafrikaner, Inuit oder Maori, die, unabhängig von Migrationsprozessen, eine sehr niedrige MS-Prävalenz aufweisen. MS kommt bei Frauen doppelt so häufig vor wie bei Männern, vom PPMS-Verlauf jedoch sind beide Geschlechter gleich häufig betroffen. Insgesamt scheinen sowohl Umwelt- als auch genetische Faktoren einen starken Einfluss auf die Prävalenz der MS zu haben (Pryse-Phillips und Costello, 2001). Weitere Hinweise für eine genetische Prädisposition der MS stammen aus Familien- und Zwillingsstudien. Eine kanadische Untersuchung zeigte, dass ungefähr 20% der MS-Patienten Verwandte ersten bis dritten Grades mit klinisch manifester MS haben. Das Risiko, im Laufe des Lebens an MS zu erkranken, betrug im allgemeinen nur 0,2%, war aber bei Verwandten ersten Grades von MS-Patienten auf 3-5% erhöht (Sadovnick et al., 1988; Sommer et al., 1996). Zudem ist die Konkordanzrate in eineiigen Zwillingen mit 30% wesentlich höher als in zweieiigen (3-5%). Genetische Untersuchungen ergaben einen Zusammenhang zwischen den Haplotypen HLA-DR15 und HLA-DQ6 des humanen Leukozytenantigens Klasse II (HLA-II) mit einer MS-Prädisposition. Das Studium weiterer Kandidatengene einschließlich der Gene, die für den T-Zellrezeptor und INF- α kodieren, ließen bisher lediglich eine Assoziation mit dem CTLA-4-Gen (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4) als wahrscheinlich erscheinen (Hillert und Masterman, 2001). CTLA-4 ist ein Rezeptor, der auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird und nach Bindung an ein B7-Molekül die Proliferation der aktivierten T-Zelle inhibieren kann (Janeway et al., 1999).

Der Einfluss von Umweltfaktoren wird nicht nur durch die geographischen Unterschiede und die relativ niedrige Konkordanzrate bei eineiigen Zwillingen deutlich. Eine ganze Bandbreite von Umweltfaktoren, wie z.B. Toxine, Anästhetika oder Hepatitis-Impfungen wurden mit MS in Zusammenhang gebracht. Keine dieser Annahmen konnte bisher bestätigt werden, und ein Zusammenhang mit Hepatitis-Impfungen wurde widerlegt (Zipp et al., 1999b). Besonderes Interesse gilt einer Assoziation mit Infektionen. Dabei wird diskutiert, ob pathogene Erreger MS auslösen oder sogar Gewebsschäden im Gehirn verursachen. So ist u.a. bekannt, dass der T-Lymphotrope Virus Typ 1 und der Masernvirus der MS ähnliche Myelopathien hervorrufen können. Diese These wird dadurch gestützt, dass im Serum von MS-Patienten erhöhte Antikörpertiter gegen Chlamydia pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae, Epstein-Barr-Virus, Masernvirus, Mumpsvirus, Influenzaviren, Rötelnvirus und Canine distemper

Virus gefunden wurden. Es gelang jedoch nicht, eine Assoziation der MS mit einem dieser Erreger im Sinne der Henle-Koch Postulate nachzuweisen. Insbesondere der Pathogenitätsnachweis (Reproduktion der Symptome beim Versuchstier) war bisher nicht möglich (Kastrukoff und Rice, 1997).

1.2.4. Pathologie und Pathogenese der MS

Wie bereits beschrieben, ist die MS durch disseminierte, aber begrenzte Hirnläsionen mit Demyelinisierung und Axonschäden gekennzeichnet. Die Läsionen in der weißen Substanz von Gehirn und Rückenmark liegen zumeist in der Nähe der Liquorräume, wie z.B. angrenzend an die lateralen Ventrikel, periaquäduktal, im Corpus callosum, Nervus opticus oder Chiasma. Man unterscheidet akute, chronisch akute und chronisch stumme Läsionen, je nach zeitlichem Verlauf und Progredienz. Neuere Arbeiten von Lucchinetti et al. (Lucchinetti et al., 1998) verweisen auf substantielle Unterschiede bei Demyelinisierungsprozessen und Oligodendrozyten-Pathologie in MS-Plaques und unterscheiden vier verschiedene histopathologische MS-Typen. Dabei herrscht bei zwei Typen der Entzündungsprozess und bei den übrigen zwei Typen der Untergang von Oligodendrozyten vor.

Die Bedeutung der direkten Axonschädigung wurde erst kürzlich erkannt. Sowohl mikroskopisch als auch durch Marker, die Axonschäden nachweisen, wie z.B. Amyloid und N-Azetylaspartat (NAA), konnte gezeigt werden, dass Axonschäden für die MS-Pathologie von essentieller Bedeutung sind. Die so genannte „Axon-Hypothese“ geht davon aus, dass Axonschäden für die anhaltenden neurologischen Defizite der MS verantwortlich sind. Mögliche Gründe für den Mechanismus der axonalen Schädigung werden zur Zeit erforscht und beinhalten: (a) eine direkte Schädigung durch Immunzellen, (b) Schädigung durch den Entzündungsprozess gegen Myelin, (c) Degeneration infolge des Verlusts der trophischen Unterstützung nach Demyelinisierung, oder aber (d) die primäre Degeneration mit sekundärer Entzündung (Trapp et al., 1999; Whitaker und Mitchell, 1996).

Bei Erklärungsmuster (d) handelt es sich um eine eher ungewöhnliche Hypothese. Denn üblicherweise wird die MS als primäre Autoimmunkrankheit angesehen, deren Angriffspunkte in erster Linie die Myelinscheiden und Oligodendrozyten des ZNS sind. Histopathologisch können in MS-Plaques Immunzellen, v.a. CD4⁺ T-Zellen, also T-Helferzellen (Th-Zellen) und ihre Produkte nachgewiesen werden. Für die These der MS als Autoimmunkrankheit sprechen außerdem: (1) die Assoziation der Erkrankung mit

dem HLA-DR2-Gen des HLA-II-Komplexes, der für die Antigenpräsentation gegenüber T-Helferzellen verantwortlich ist (Compston und Sadovnick, 1992; Haines et al., 1998), (2) die erhöhte Rate an myelinspezifischen $CD4^+$ Zellen, die im Blut von MS-Kranken zirkulieren (Zhang und Raus, 1994), (3) eine autochthone Antikörperproduktion im Liquor von MS-Patienten, ohne dass ein Erreger nachgewiesen werden kann, (4) die Induzierbarkeit eines MS-ähnlichen Krankheitsbildes bei Mäusen (experimentell-autoimmune Enzephalomyelitis, EAE) nach Transfer myelinspezifischer $CD4^+$ Zellen oder aktiver Immunisierung mit Myelinproteinen (Martin und McFarland, 1995) und (5) die Besserung der MS-Symptomatik unter immunomodulatorischer Therapie (Zipp et al., 1997b).

Die MS wird von einigen Forschern als T-Helferzell-1-vermittelte Autoimmunerkrankung angesehen. Th1-Zellen sind $CD4^+$ Effektor-T-Zellen die vor allem pro-inflammatorische Zytokine wie IL-2, IL-12, $IFN-\gamma$ und $TNF-\alpha$ sezernieren. $IFN-\gamma$ und $TNF-\alpha$ stimulieren antigenpräsentierende Zellen und führen zur Hochregulation von HLA-II und Adhäsionsmolekülen in MS-Plaques. Die myelinspezifischen T-Zellen in der EAE und bei MS-Kranken sind vornehmlich vom Th1-Typ (Zipp, 2000). Th-Zellen vom Th2-Typ hingegen produzieren anti-inflammatorische Zytokine wie IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10, die vor allem auf die humorale Immunantwort wirken und zugleich die Expression von Th1-Zytokinen herunterregulieren (Janeway et al., 1999).

1.2.5. Therapie der MS

Traditionell werden in der Therapie der MS im akuten Schub vor allem Glukokortikoide eingesetzt. Orales oder intravenöses Methylprednisolon begrenzt perifokale Ödeme und wirkt immunsuppressiv. Der Wirkmechanismus besteht wahrscheinlich in der Stabilisierung der Blut-Hirn-Schranke, der Inhibition der Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine und sowohl der Inhibition als auch der Induktion von Apoptose (Gelati et al., 2002; Zipp et al., 2000b).

In den letzten Jahren kamen bei der RRMS zusätzlich zur Akuttherapie verstärkt Immunomodulatoren als Langzeittherapeutika zum Einsatz. Dazu gehört vor allem subkutan oder intramuskulär gegebenes Interferon- β ($IFN-\beta$). Mehrere multizentrische, randomisierte, doppelblinde, plazebokontrollierte Studien konnten eine signifikante Verringerung der Frequenz der akuten Schübe und der Anzahl der im MRT sichtbaren Plaques, sowie eine verlangsamte Progredienz der körperlichen Behinderungen belegen

(1995; 2001). Neuere Daten zeigten, dass IFN- β auch schon bei Krankheitsbeginn wirksam ist (Jacobs et al., 2000). In mehreren Studien (CHAMPS, ETOMS) wurde daraufhin die Effektivität der IFN- β Therapie bei Erstmanifestation bzw. CIS bestätigt (Kieseier und Hartung, 2003). Auch Glatiramer Acetate (GA, auch als Copolymer-1 bezeichnet) erwies sich in einer multizentrischen, randomisierten, doppelblinden, plazebokontrollierten Studie als wirksam (Johnson et al., 1995; Johnson et al., 1998).

Die genauen Wirkmechanismen der Immunomodulatoren GA und IFN- β sind bis heute nicht vollständig geklärt. GA ist ein Zufalls-Polypeptid aus vier Aminosäuren, welches ursprünglich zur Auslösung von EAE in Versuchstieren vorgesehen war. Bei IFN- β handelt es sich um ein klassisches pleiotropes Zytokin, ursprünglich bekannt für seine antiviralen und -tumoralen Effekte. Einige Autoren betrachten die positive Wirkung von IFN- β bei MS vor allem als Folge eines Wechsels der Dominanz von CD4⁺-Zellen mit pro-inflammatorischem Th1-Profil zu CD4⁺-Zellen mit einem anti-inflammatorischen Th2-Profil, dem so genannten Th1/Th2-Shift (Yong et al., 1998). In der Pharmakotherapie wird zwischen IFN- β -1a (in den meisten Ländern zugelassen unter den Handelsnamen Avonex und Rebif) und IFN- β -1b (Betaferon/ Betaseron) unterschieden. Zwischen diesen gleichartig erscheinenden Substanzen existieren dennoch Unterschiede bezüglich der Pharmakokinetik und Applikation (Avonex einmal pro Woche intramuskulär, Rebif dreimal pro Woche subkutan, Betaferon täglich subkutan). Die Nebenwirkungsprofile der verschiedenen Interferone sind ähnlich und bestehen in grippeähnlichen Symptomen wie Fieber, Übelkeit und Erbrechen, Myalgien, Arthralgien, Depression, erhöhten Leberwerten und selten Leukopenie oder Anämie. Auch die Effektivität der unterschiedlichen Interferone ist vergleichbar und hängt u.a. von der Dosierung ab. Es bestehen jedoch Hinweise darauf, dass IFN- β -1a vor allem die anti-inflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-10 induziert und einen Th1/Th2-Shift fördert, wogegen eine IFN- β -1b Therapie mit niedrigeren Serumkonzentrationen des pro-inflammatorische Zytokins IFN- γ verbunden ist (Sega et al., 2004). In dieser Arbeit wurde ausschließlich IFN- β -1a verwendet.

Weitere, weniger etablierte Therapeutika für die RRMS, für die positive Wirkungen angenommen werden, sind intravenöse Immunglobuline (IVIG) (Sorensen et al., 2002) und Mitoxantron (Neuhaus et al., 2004). Die Therapie der primär bzw. sekundär chronisch-progredienten MS gestaltet sich als äußerst schwierig. Dabei kommen u.a. Substanzen wie IFN- β , Mitoxantron, Cyclophosphamid, Methotrexat, Nataliezumab,

Azathioprin und Cyclosporin zur Anwendung (Hartung et al., 2002; Noseworthy, 2003).

1.3. Die Bedeutung der Apoptose in der Pathogenese der MS

Apoptose stellt einen Effektormechanismus dar, durch den immunkompetente Zellen virusinfizierte oder tumorös entartete Zellen eliminieren können. Zusätzlich spielt die Apoptose eine Rolle bei der Kontrolle des Immunsystems, da sie insbesondere durch den AICD zur spezifischen Begrenzung immunologischer Reaktionen beiträgt. Bereits aktivierte T-Zellen werden dabei nach erneuter Aktivierung über das CD95-Rezeptor/CD95-Ligand-System apoptotisch abgeschaltet (Lenardo et al., 1999).

Die folgende Hypothese über die MS-Pathogenese unterstützt das Autoimmun-Paradigma und hat derzeit die breiteste Akzeptanz: (1) Periphere T-Zellen, die spezifisch für basisches Myelinprotein (MBP) oder ein anderes Myelin-Protein sind, werden aktiviert. Für den genauen Mechanismus der Aktivierung bestehen bisher nur wenige Hypothesen: (a) Virale Proteine von Herpes simplex, Adeno- oder Epstein-Barr-Viren oder bakterielle Bestandteile stimulieren direkt myelinspezifische T-Zellen (Wucherpfennig und Strominger, 1995). (b) Gegen Fremdantigen gerichtete Antikörper oder T-Zellen reagieren im Sinne einer Kreuzreaktion mit körpereigenen Epitopen (molecular mimicry). (c) T-Zellen unterschiedlicher Spezifität werden durch ein einzelnes so genanntes „Superantigen“ aktiviert (Wucherpfennig, 2001). Letztendlich würden aktivierte autoreaktive Zellen aber apoptotisch eliminiert werden. Ein (d) Defekt in Apoptosesystemen könnte zum Überleben dieser Zellen bei MS-Patienten beitragen. (2) Die aktivierte T-Zelle migriert nun durch die Blut-Hirn-Schranke in das ZNS. Dieser Prozess wird durch eine Reihe von Molekülen wie Adhäsine, Selectine, Integrine und Matrix-Metalloproteasen vermittelt, die ebenfalls an der MS-Pathologie beteiligt sein könnten. (3) Im ZNS treffen die aktivierten myelinspezifischen T-Zellen auf ihr Antigen, welches, um von den CD4⁺ T-Zellen erkannt zu werden, auf einem HLA-II-Molekül von einer APC präsentiert werden muss (Wekerle, 1993). (4) Die aktivierten T-Lymphozyten sezernieren daraufhin Zytokine wie TNF- α/β und IFN- γ , die einen Entzündungsprozess initiieren, der zur Zerstörung der Myelinscheiden, Oligodendrozyten und Axone führt (Abb. 2). Der Untergang der Oligodendrozyten ist wahrscheinlich durch Apoptose verursacht (Markovic-Plese und McFarland, 2001).

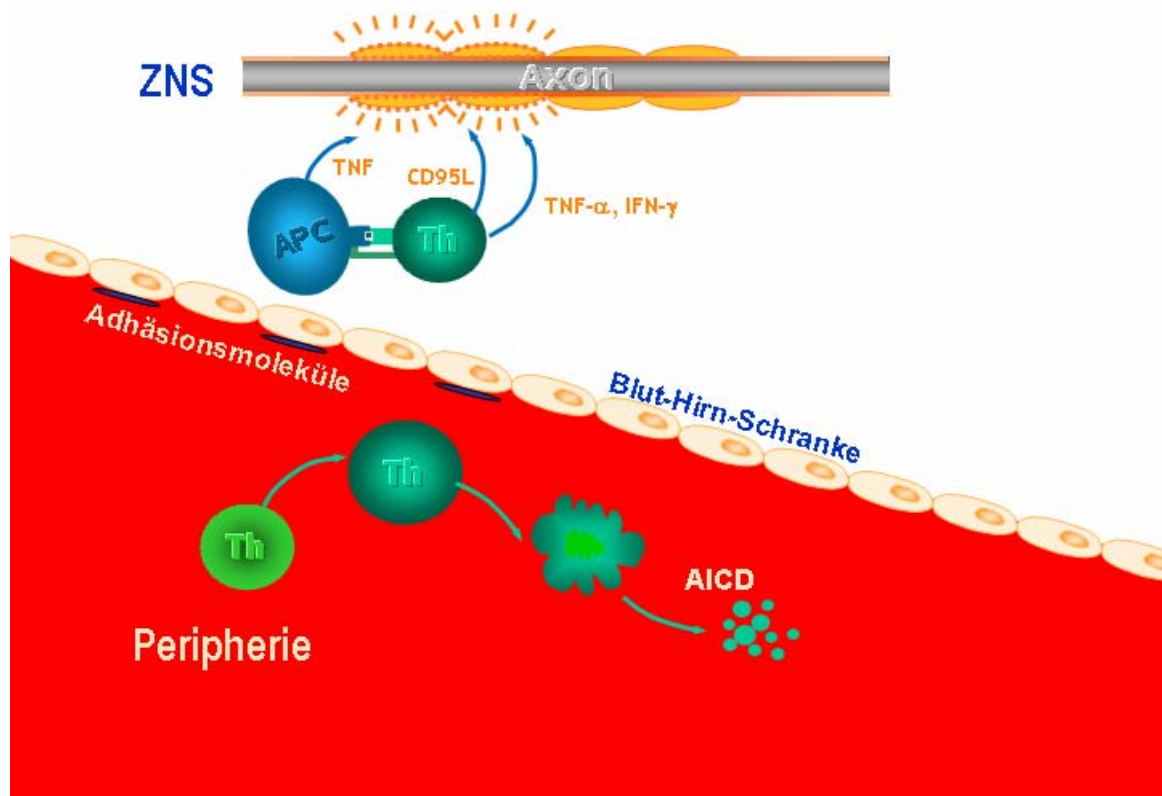


Abbildung 2: Die Pathophysiologie der MS: Aktivierte autoantigen-spezifische Th-Zellen, die nicht durch den AICD eliminiert wurden, migrieren durch die Blut-Hirn-Schranke. Im ZNS treffen die Th-Zellen auf ihr spezifisches Zielantigen, welches durch APC präsentiert wird. Daraufhin sezernieren sie proinflammatorische Zytokine und induzieren einen parenchymschädigenden Entzündungsprozess (adaptiert nach Waiczies, 2003).

Demnach könnte ein Zuwenig an Apoptose in der Peripherie im Zusammenspiel mit einem Zuviel an Apoptose im ZNS eine entscheidende Rolle für die Krankheitsentstehung der MS spielen: Einerseits führt eine eingeschränkte Apoptose zur pathologischen Persistenz aktivierter myelinspezifischer T-Zellen. Andererseits wird auf der Endstrecke der entzündlichen Reaktion Glia- und eventuell auch Nervenzellgewebe durch apoptotischen Zelluntergang geschädigt (Zipp, 2000).

Die zentrale pathogenetische Bedeutung autoreaktiver T-Zellen wird nicht zuletzt auch durch die Auslösung der Transfer-EAE in gesunden Versuchstieren durch die Übertragung aktivierter spezifischer T-Zellen, die Myelin oder Gliaproteine erkennen, belegt (Martin und McFarland, 1995). Dennoch stellt die bloße Existenz myelinspezifischer T-Zellen in einem Individuum noch keine Gefahr dar, solange diese nicht aktiviert sind. Obwohl man annimmt, dass schon während der Antigenprägung im Thymus jene T-Vorläuferzellen, die eine hohe Affinität zu körpereigenen Epitopen aufweisen, im Rahmen der negativen Selektion durch Apoptose eliminiert werden, sind

myelinspezifische T-Zellen auch bei gesunden Probanden nachgewiesen worden (Fowlkes et al., 1988; Jenkinson et al., 1989). Solche T-Zellen könnten nun durch eine Aktivierung klonal proliferieren und sich zu Effektorzellen differenzieren. Die T-Zell-Antwort kann im Verlauf der MS erstaunlich stabil bleiben oder sich auf andere Epitope oder gar Proteine („epitope spreading“) ausdehnen (Goebels et al., 2000).

Im gesunden Individuum wirken effektive Kontrollmechanismen der Aktivierung autoantigener T-Zellen entgegen: Eine Aktivierung voraktivierter T-Zellen führt zu einer apoptotischen Eliminierung durch den CD95- oder TNF-abhängigen AICD und ein Kontakt naiver T-Zellen mit nicht-professionellen APC zu Anergie (aktivierungsrefraktärer Zustand) (Janeway et al., 1999). Seit kurzem wird vermutet, dass neben dem AICD auch regulatorische $CD4^+CD25^+$ -T-Zellen an der Selbsttoleranz des Immunsystems beteiligt sein könnten (Viglietta et al., 2004). Tierversuche hatten nämlich gezeigt, dass eine Depletion dieser Suppressor-Zellen zur Auslösung von systemischen Autoimmunphänomenen bei Mäusen führt (Sakaguchi, 2000).

1.3.1. Bedeutung des CD95 Signalweges

Die Bedeutung des CD95 Signalweges für die spezifischen Begrenzung immunologischer Reaktionen wird durch zwei Knock-out Mausmodelle deutlich: *lpr/lpr* (lymphoproliferation) Mäuse haben keinen funktionierenden CD95-Rezeptor und dienen als ein Tiermodell für den systemischen Lupus erythematosus (SLE); *gld/gld* (generalized lymphoproliferative disease) Mäuse besitzen kein CD95L und entwickeln eine generalisierte Lymphoproliferation. Außerdem entwickeln *gld*-Mäuse ein vergleichsweise schweres Krankheitsbild in der passiven Transfer-EAE (Sabelko-Downes et al., 1999). Beide Mausarten sind nicht in der Lage, mit Hilfe des CD95-Systems autoreaktive Lymphozyten zu eliminieren. Menschen mit einem ähnlichem Phänotyp, z.B. mit einem Canale-Smith Syndrom oder autoimmunem lymphoproliferativen Syndrom, haben ebenfalls Mutationen im CD95-Genabschnitt (Nagata, 1998; Rieux-Laucat et al., 1995).

Neuere Befunde sprechen für eine Fehlregulation des AICD bei MS-Patienten, die zum Überleben aktivierter autoreaktiver T-Zellen führt (Zang et al., 1999; Zipp et al., 1998d). Als Ursache hierfür kommen die von Zipp et al. nachgewiesenen erhöhten Konzentrationen an sCD95 in Serum und Liquor von MS-Patienten in Betracht. sCD95 ist in der Lage an CD95L zu binden, und somit Apoptose zu verhindern (Zipp et al., 1998d). Möglicherweise kann es so zu einer Verminderung des AICD kommen (Abb.3).

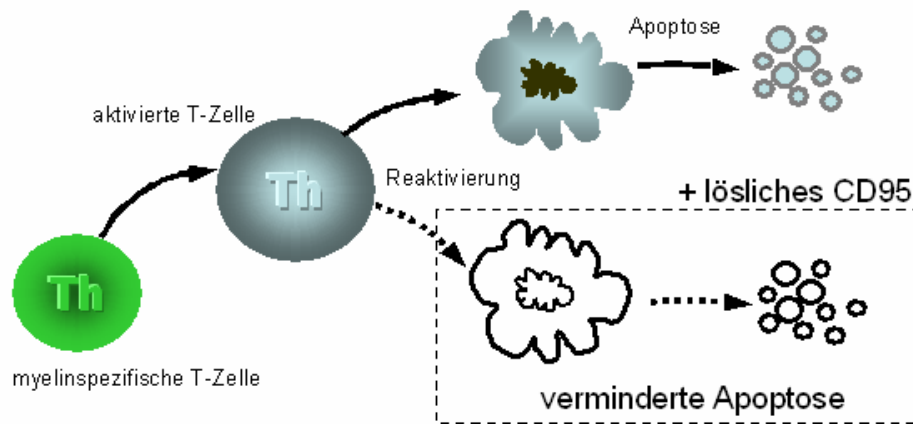


Abbildung 3: Modulation des AICD durch lösliches CD95

Interessanterweise korrelierten die sCD95-Serumkonzentrationen der im Verlauf beobachteten Patienten auch mit dem Grad der Behinderung, gemessen als „expanded disability status scale“, EDSS (Kurtzke, 1983). Zudem kam es unter Behandlung mit IFN- β -1b nach einem initialen Anstieg zu einer Reduktion der sCD95-Serumkonzentrationen und zur Besserung des Krankheitsverlaufes. Diese Effekte konnten bei Patienten, die neutralisierende Antikörper gegen IFN- β (NAB) entwickelten, nicht festgestellt werden (Zipp et al., 1998d).

Auch die Expression von CD95L bei MS wurde gegenüber gesunden Kontrollpersonen als signifikant höher beschrieben (Huang et al., 2000). Im Gegensatz dazu besteht wahrscheinlich kein Zusammenhang zwischen MS und dem Ausmaß der Expression von CD95 auf peripheren Blutzellen und T-Zellen (Huang et al., 2000; Zipp et al., 1998a).

Das CD95-System ist nicht nur bedeutsam für die Homöostase des Immunsystems, sondern hat möglicherweise auch gewebeschädigende Wirkungen im Rahmen von Entzündungsreaktionen. Obwohl unklar ist, ob die Apoptose der vorherrschende Mechanismus für die Gewebsschädigung in der MS ist (Dowling et al., 1997), gibt es Hinweise für eine vermehrte Expression von CD95L auf Mikroglia, T-Zellen, Astrozyten und Oligodendrozyten in MS-Plaques (Dowling et al., 1997; D'Souza et al., 1996). Auch im normalen menschlichen ZNS ist funktionell aktives CD95L auf Neuronen und perivaskulär gelegenen Astrozyten nachweisbar und könnte einen wichtigen Mechanismus für das Immunprivileg des ZNS darstellen (Bechmann et al., 1999; Bechmann et al., 2002).

Der programmierte Zelltod hat nicht nur für die Initiation, sondern auch für die Modulierung und Beendigung von Entzündungsreaktionen eine Bedeutung. So ist bei

der EAE in der Remissionsphase eine erhöhte intrazerebrale Apoptose von T-Zellen nachweisbar (Schmied et al., 1993).

1.3.2. Bedeutung des TRAIL Signalweges

Während TRAIL in der Lage ist, in vielen Tumorzellen Apoptose auszulösen, sind eine Reihe nicht-transformierter Zellen resistent gegen TRAIL (Walczak, 1999). Das Gleiche gilt für normale T-Zellen: Sie sind resistent gegen lösliches trimerisiertes TRAIL (Wendling et al., 2000). Tiermodellstudien für Autoimmunkrankheiten dagegen fanden Anhalt für eine Beteiligung des TRAIL-Systems an der Inhibition von Autoimmunkrankheiten (Hilliard et al., 2001; Song et al., 2000). Song et al. behandelten Mäuse mit experimentell induzierter Rheumatoider Arthritis (RA) mit rekombinantem löslichen DR5 (sDR5). sDR5 ist in der Lage, den Apoptose auslösenden Effekt von TRAIL in Tumorzellen zu blockieren. Im RA-Mausmodell wurde der Krankheitsverlauf durch die systemische Behandlung mit sDR5 gegenüber Kontrollgruppen signifikant exazerbiert. Dagegen konnte der Krankheitsverlauf durch intraartikuläre Injektion von mit dem TRAIL-Gen transfizierten Viren temporär gemildert werden. Ein Jahr später reproduzierten Hilliard et al. dieses Ergebnis im MS-Tiermodell, der EAE. Der Schweregrad der Krankheit und der ZNS-Entzündung war nach systemischer TRAIL-Blockade signifikant erhöht. Diese Ergebnisse implizieren, dass die systemische Blockade von TRAIL zur Steigerung von Autoimmunprozessen führen kann und TRAIL eine wichtige Rolle in der Homöostase des Immunsystems spielt.

Interessanterweise konnte in Experimenten von Hilliard et al. kein Unterschied in der Apoptose-Aktivität im ZNS zwischen Kontroll- und behandelten Tieren festgestellt werden. Stattdessen ergaben sich Hinweise darauf, dass TRAIL regulatorisch auf den Zellzyklus wirkt, indem es die Progression von der G1-Phase zur S-Phase unterbindet (Song et al., 2000).

Studien in humanem Hirnbiopsiegewebe zeigten die Abwesenheit von TRAIL, aber die Expression von Apoptose-vermittelnden (DR4 und DR5) und Apoptose-inhibierenden TRAIL-Rezeptoren (DcR1 und DcR2) auf Oligodendrozyten und Neuronen (Dorr et al., 2002). Damit wäre eine Induktion von Apoptose in Neuronen durch eindringende, TRAIL-exprimierende T-Zellen z.B. im Rahmen eines Autoimmunprozesses denkbar. Nitsch et al. (Nitsch et al., 2000) konnten in Experimenten mit humanen Hirnschnittkulturen die Wahrscheinlichkeit einer solchen Hypothese stützen. Obwohl TRAIL in Mäusen als nicht neurotoxisch charakterisiert wurde (Roth et al., 1999),

konnte sTRAIL in relativ hoher Konzentration Apoptose in humanen Neuronen, Oligodendrozyten und Mikrogliazellen auslösen.

Ein weiteres Argument für eine mögliche Beteiligung des TRAIL-Systems an der MS-Pathogenese ergibt sich aus den Veröffentlichungen von Huang et al. Allerdings steht die von Huang et al. nachgewiesene signifikant erhöhte TRAIL-mRNA Expression in PBMC's von MS-Patienten gegenüber Gesunden scheinbar im Widerspruch zu den oben beschriebenen Experimenten von Song et al. und Hilliard et al. (Huang et al., 2000). Dennoch wäre eine Erhöhung der TRAIL-Expression als Gegenregulation des Körpers auf Autoimmunprozesse vorstellbar.

1.4. Fragestellung

Das Ziel dieser Arbeit ist es, zu einem besseren Verständnis der Regulation und Bedeutung des (A) TRAIL-Rezeptor/TRAIL-Systems und (B) des CD95/CD95L-Systems für die Pathogenese der Multiplen Sklerose beizutragen.

Zusammenfassend lassen sich die Ziele dieser Arbeit folgendermaßen darstellen:

(A)

- (1) Welche Zellen sind in der Lage, TRAIL auf der Zelloberfläche zu exprimieren oder lösliches TRAIL zu sezernieren?
- (2) Wie wird die Expression membranständigen und löslichen TRAILS reguliert? Welche Wirkung hat das in der Langzeitbehandlung der MS erfolgreich eingesetzte Therapeutikum IFN- β auf die TRAIL-Expression?
- (3) Gibt es Unterschiede in der TRAIL-Expression zwischen MS-Kranken und gesunden Probanden?
- (4) Gibt es neben der Apoptose noch andere Effektormechanismen von TRAIL?

(B)

- (5) Welche Zellen sind in der Lage, sCD95 zu sezernieren?
- (6) Wie wird die Expression von sCD95 reguliert? Welche Wirkung hat das in der Langzeitbehandlung der MS erfolgreich eingesetzte Therapeutikum IFN- β auf die sCD95-Expression?
- (7) Gibt es Unterschiede in der sCD95-Expression zwischen gesunden Probanden und MS-Kranken?

- (8) Kann die verringerte Krankheitsaktivität der MS während der Schwangerschaft mit Veränderungen der Expression von sCD95 in Zusammenhang gebracht werden?

Zu (1), (2) und (3): Unter der Annahme, dass die Expression von TRAIL-mRNA und somit TRAIL-Protein bei MS-Patienten gegenüber Gesunden tatsächlich erhöht ist (Huang et al., 2000), stellt sich die Frage, welche peripheren Immunzellen überhaupt dazu beitragen. Im Mittelpunkt der MS-Forschung steht traditionellerweise das T-Zellsystem (Zipp, 2000). Zu Beginn der hier beschriebenen Experimente gab es bereits Hinweise auf eine Oberflächenexpression von TRAIL auf T-Zellen (Martinez Lorenzo et al., 1998). Die Frage, ob T-Zellen oder andere Immunzellen sTRAIL mit möglicher systemischer Wirkung produzieren, hat große pathogenetische Relevanz. Daher wurden T-, B-Zellen und Makrophagen aus menschlichem Blut u.a. mittels magnetischer Zellsortierung (MACS) gewonnen, um sofort oder nach Zellkultur die sTRAIL-Produktion im ELISA und die Expression von membrangebundenem TRAIL mit einem Durchflusszytometer (FACS) zu analysieren.

Da die systemische Blockade von TRAIL im Tierversuch den Krankheitsverlauf von Autoimmunkrankheiten verschlimmert (Hilliard et al., 2001; Song et al., 2000), sollte zusätzlich überprüft werden, unter welchen Bedingungen die TRAIL-Expression zunimmt. Dazu wurden Immunzellen mit bekannten zellspezifischen Stimuli aktiviert. Weiterhin sollte die Hypothese überprüft werden, dass der immunomodulatorische Effekt von dem in der MS-Therapie erfolgreich eingesetzten IFN- β (Kieseier und Hartung, 2003) auch durch eine Interferenz mit dem TRAIL-System entsteht. Für diese Hypothese bestanden Hinweise aus den Experimenten von Kayagaki et al., die einen Einfluss von Typ-I-Interferonen auf TRAIL nachwiesen (Kayagaki et al., 1999). Deshalb wurden Leukozyten in parallelen Ansätzen mit IFN- β inkubiert. Die Funktionsfähigkeit des nachgewiesenen sTRAIL wurde in Apoptosenachweisen mit TRAIL-suszeptiblen Zellen getestet.

Durch die Kenntnis der Regulation und Expression von TRAIL lassen sich Hypothesen über dessen Wirkung im Rahmen der Pathogenese der MS aufstellen. Doch bestehen tatsächlich Unterschiede in der Expressionsstärke von löslichem oder membrangebundenem TRAIL zwischen MS-Patienten und gesunden Probanden, die zu einer Krankheitsentstehung beitragen? Um mögliche Aberrationen des TRAIL-Systems im MS-Krankheitsprozess zu erkennen, wurde die TRAIL-Expression von PBMC von

MS-Patienten und Kontrollpersonen verglichen.

Zu (4): Unter den sich verdichtenden Hinweisen, dass TRAIL keine Apoptose in menschlichen Immunzellen auslöst (Wendling et al., 2000), sollte hier der Frage nachgegangen werden, inwieweit TRAIL dennoch immunomodulatorisch wirken kann. Aus den Tierversuchen von Song et al. und Hilliard et al. ergaben sich Anhaltspunkte für eine mögliche hypoproliferative Wirkung von TRAIL (Hilliard et al., 2001; Song et al., 2000). Eine weitere hier zu untersuchende Hypothese war deshalb die Inhibition der Aktivierung und Proliferation von humanen T-Zellen durch TRAIL. Dazu wurde die Proliferation von stimulierten humanen T-Zelllinien nach Inkubation mit TRAIL bestimmt sowie die Zytokinkonzentrationen im Zellkulturüberstand von diesen Zellen analysiert.

Zu (5), (6) und (7): Die Oberflächenexpression von CD95 ist relativ gut erforscht (Huang et al., 2000; Zipp et al., 1998a). Weniger klar war, durch welche Zellpopulationen sCD95 sezerniert wird. Da sCD95 im Serum von MS-Patienten erhöht ist und mit einer zunehmenden Behinderung der Patienten korreliert (Zipp et al., 1998d), erschien es wichtig zu ergründen, welche Zellreihen für die erhöhten sCD95-Konzentrationen verantwortlich gemacht werden können. Natürlich trägt auch die Kenntnis der Regulation der sCD95-Sekretion in den verschiedenen Zellreihen zu einem besseren Verständnis des MS-Krankheitsgeschehens bei. Besonders interessant erschien hier wiederum die durch Zipp et al. gefundene Herabregulation der sCD95-Serumkonzentration nach IFN- β Therapie (Zipp et al., 1998d). Deshalb wurden humane T-, B-Zellen und Makrophagen isoliert, zum Teil kultiviert und stimuliert bzw. IFN- β ausgesetzt, um dann sCD95 im Zellkulturüberstand mittels eines ELISA zu bestimmen. Zusätzlich wurde geprüft, ob den erhöhten Serumkonzentrationen bei MS-Patienten Unterschiede in der Sekretion von sCD95 in vitro im Vergleich zu Gesunden zugrunde liegen.

Zu (8): Wenn niedrige sCD95-Konzentrationen im Serum zu niedrigerer Krankheitsaktivität führen, stellt sich die Frage, ob der vielfach beobachtete benignere Verlauf der MS in der Schwangerschaft (Birk et al., 1990; Birk et al., 1988) ebenfalls mit reduzierten sCD95-Serumkonzentrationen assoziiert ist oder ob andere immunomodulatorische Effekte dafür in Betracht gezogen werden müssen. Um diese

Frage zu beantworten, wurde sCD95 im Serum einer großen Gruppe MS-kranker Schwangeren vor, zu mehreren Zeitpunkten während, sowie nach der Schwangerschaft bestimmt. Die relativ heterogenen Daten wurden mit multivariaten statistischen Methoden ausgewertet.

2. Materialien und Methoden

2.1. Patientenkollektiv und gesunde Kontrollen – Gewinnung der Proben

In dieser Studie wurden humane Leukozyten von MS-Patienten und gesunden Kontrollindividuen (im Text auch als „gesunde Probanden“, „gesunde Kontrollen“ oder „Gesunde“ bezeichnet) kaukasischer Abstammung im Alter von 18-55 Jahren verwendet. Einschlusskriterien für Patienten waren klinisch manifeste MS (McDonald et al., 2001), ein schubförmig remittierender (RRMS) Krankheitsverlauf mit mindestens zwei Schüben in den letzten zwei Jahren sowie eine schriftliche Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie. Einschlusskriterium für gesunde Kontrollindividuen war die Abwesenheit von MS und anderer neurologischer Erkrankungen sowie eine schriftliche Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie.

Immunsuppressive oder -modulierende Behandlung in den letzten sechs Monaten vor Blutentnahme sowie Anzeichen von infektiösen, malignen, metabolischen oder anderen systemischen Erkrankungen führten zum Ausschluss des Spenders aus der Studie. Blut wurde mit Lithium-Heparin-Monovetten abgenommen und innerhalb von zwölf Stunden weiter verarbeitet.

Für die Analyse von sCD95-Konzentrationen im Serum von schwangeren MS-Patientinnen galten die gleichen Bedingungen, allerdings wurde hier eine immunsuppressive oder -modulatorische Therapie innerhalb der letzten sechs Monaten nicht als Ausschlusskriterium definiert. Serum wurde mit Hilfe von Serumröhrchen gewonnen, zentrifugiert, in Eppendorfgläser überführt und bei -80°C bis zur Proteinbestimmung gelagert.

2.2. Zellisolation

2.2.1. Separation peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC)

Prinzipien

Die Methode basiert auf der unterschiedlichen Dichte verschiedener Zellen. Es werden Dichtegradienten verwendet, um mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cells, PBMC), die eine niedrige Dichte haben, von Erythrozyten und Granulozyten, die eine hohe Dichte haben, zu trennen. Gleichzeitig werden lebende Zellen (niedrige Dichte) von toten Zellen (hohe Dichte) getrennt.

Prozedur

In 50ml-Röhrchen wurden Dichtegradienten hergestellt, indem 15ml Ficoll-Lösung (Lymphoprep) mit 25ml Blut überschichtet wurden. Die anschließende Gradientenzentrifugation erfolgte bei 700g bei Raumtemperatur (RT) über 40min ohne Bremse. Dabei formten PBMC und Thrombozyten einen Ring an der Gradientenzwischenschicht, während Erythrozyten und Granulozyten ein Pellet am Boden des Röhrchens bildeten.

Der Lymphozytenring wurde mit einer sterilen Pasteurpipette in ein neues 50ml Röhrchen überführt und erneut bei 500g und RT über 20min zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 20ml PBS resuspendiert und erneut bei 500g und RT über 15min zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 10ml Waschmedium aufgelöst, die Zellen wurden in einem Neubauer-Hämatocytozometer gezählt (s.u.) und weiter verarbeitet.

2.2.2. Kryokonservierung peripherer mononukleärer Blutzellen

Zellen wurden bei -80°C eingefroren, um später Experimente mit PBMC von verschiedenen unbehandelten MS-Kranken in Remission zum gleichen Zeitpunkt durchführen zu können.

Durchführung

Die Zellsuspension wurde in ein steriles 50ml Röhrchen überführt und in Neubauer-Hämatocytoometern gezählt. T-Zellen wurden in einer Konzentration von 3×10^6 /ml und PBMC in einer Konzentration von 10^7 /ml in 0,5ml Einfriermedium aufgenommen. Anschließend wurden 0,5ml einer 20%igen eiskalten Dimethylsulfoxid-(DMSO)-Lösung hinzugegeben, um die zellschädigende Bildung intrazellulärer Eiskristalle beim Einfriervorgang zu verhindern. Die Suspension wurde in auf Eis gelagerte Kryoröhrchen überführt, welche dann zum langsamen Abkühlen der Zellen für weitere zwei Stunden in einer Styroporbox bei -20°C gelagert wurden. Danach wurden die Kryoröhrchen in den Stickstofftank überführt und bei -80°C aufbewahrt.

Die sachgemäße Durchführung der Kryokonservierung wurde kontrolliert, indem bei jedem Auftauprozess die Proliferationsfähigkeit der Zellen im [^3H]Thymidintest nachgewiesen (s.u.) wurde.

2.2.3. Auftauen der kryokonservierten peripheren mononukleären Blutzellen

Das Auftauen von Zellen musste zügig erfolgen, damit gebildete Eiskristalle rasch auftauen und das zellschädigende DMSO möglichst schnell verdünnt wurde. Zum Auftauen wurde speziell angefertigtes Auftaumedium verwendet (s.u.).

Durchführung

Ein Kryoröhrchen mit der eingefrorenen Zellsuspension wurde aus dem Stickstofftank genommen und sofort in einen mit 37°C warmem Wasser gefüllten Behälter gegeben. Dort wurde es solange geschwenkt, bis sich ein nur noch linsengroßes Eiskristall in der Suspension befand. Anschließend wurde das Kryoröhrchen sofort auf Eis gestellt und unter sterilen Bedingungen mit einer Eppendorfpipette in ein steriles Falcon-Röhrchen mit 10ml Auftaumedium überführt. Die Zellen wurden bei 800g und RT über 10min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit Waschmedium gelöst und gezählt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in einer Konzentration von 10^6 Zellen/ml in FCS-Medium suspendiert (Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-Medium 1640, ergänzt mit 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin und 10% Fetalem Kälber Serum, nachfolgend als „FCS-Medium“ bezeichnet).

2.2.4. Magnetische Zelltrennung (MACS)

Prinzipien

Magnetische Zelltrennung (magnetic cell sorting, MACS) wird verwendet, um spezifische Zellpopulationen zu isolieren. Dafür werden spezifische monoklonale Antikörper (AK), an die kleine magnetische Partikel (20-100nm im Durchmesser, sogenannte Microbeads) gekoppelt sind, genutzt. Die Zellen werden mit dem gewünschten gekoppelten Antikörper inkubiert und dann gewaschen, um den Überschuss an nicht gebundenen Antikörpern zu entfernen. Anschließend wird die hochkonzentrierte Zellsuspension durch eine Säule geleitet, die ferromagnetische Matrix enthält und sich in einem Magnetfeld befindet. Die mittels der gekoppelten Antikörper magnetisch markierten Zellen verbleiben in der Säule, während die unmarkierten Zellen die Säule mit der Flüssigkeit verlassen. Nach Entfernung des Magnetfelds, kann man die markierten Zellen aus der Säule spülen.

Die MACS-Technik kann zur positiven und negativen Selektion von spezifischen

Zellpopulationen verwendet werden.

Isolation von T-, B-Zellen und Monozyten

Für alle Schritte wurden 50ml Falcon-Röhrchen verwendet und alle Zentrifugationsvorgänge wurden bei 500g und 8°C für 10min ausgeführt. Frisch isolierte PBMC wurden in eiskaltem MACS-Trennpuffer, bestehend aus PBS, 2mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), und 5% FCS gelöst. Die Zellsuspension wurde durch Filter (Milipore) geleitet, um Zellverklumpungen und tote Zellen abzutrennen. Ein Teil der PBMC wurde nun auf Eis für Kontrollexperimente wie Proliferationsanalysen und FACS aufbewahrt. Der andere Teil, maximal 5×10^7 PBMC, wurde zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit Trennpuffer und 20µl Microbeads pro 10^7 Zellen in einem Endvolumen von 100µl pro 10^7 PBMC suspendiert. Für den ersten Schritt wurden anti-CD14-AK-gekoppelte Microbeads (für Monozyten) benutzt. Die Zell-Microbead-Suspension wurde für 15min bei 8°C inkubiert und anschließend mit 10ml Trennpuffer aufgefüllt und zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 500µl Trennpuffer gelöst. Mit ferromagnetischer Matrix gefüllte Säulen der Größe MS wurden im Magnetfeld platziert und einmal mit Trennpuffer gespült. Die Säulen dieser Größe können mit maximal 2×10^8 Zellen beladen werden, aber nur 10^7 Zellen zurückhalten. Anschließend wurden die markierten Zellen in Suspension appliziert, und das Eluat und die Flüssigkeit der nachfolgenden drei Spülvorgänge mit Trennpuffer wurden als negative, d.h. keine Microbeads enthaltende, Fraktion in einem Röhrchen aufgefangen. Nun wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die positive Fraktion wurde mit 1ml Trennpuffer unter Druck mit einem Pfropfen herausgespült. Die so erhaltene positive Fraktion wurde mittels FACS-Technik auf ihre Reinheit geprüft und dann für weitere Experimente oder Zellkulturen verwendet.

Die negative Fraktion wurde mit Trennpuffer zweimal gewaschen und dann für eine erneute magnetische Trennung mit zunächst anti-CD19-AK-gekoppelten Microbeads (für B-Zellen) und in einem dritten Schritt mit anti-CD3 Microbeads (für T-Zellen) verwendet.

2.3. Zellkultur

2.3.1. PBMC

Frisch isolierte oder kryokonservierte PBMC wurden generell in einer Konzentration von $1 \times 10^6/\text{ml}$ in FCS-Medium suspendiert und in 48-well oder 96-well Mikrotiterplatten aliquotiert. Je nach Ansatz wurden die Zellen nicht stimuliert (Kontrolle) oder mit einer der folgenden Agenzien aktiviert:

- $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ Phytohämagglutinin (PHA)
- $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ PHA + $20 \text{ U}/\text{ml}$ rekombinantes humanes IL-2
- 0,01% Staphylokokkus Aureus Cowman Strain (SAC)
- $2,5 \text{ ng}/\text{ml}$ IL-4 und $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ anti-CD40-AK
- $50 \text{ ng}/\text{ml}$ Lipopolysacharid (LPS)
- 10 – 1000 IU IFN- β -1a
- Antigen ($20 \text{ pg}/\text{ml}$ MBP, $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ Tetanustoxoid (TT) oder $5 \mu\text{g}$ Birkenpollen (BP))

Die Inkubation erfolgte im Brutschrank (37°C , 5% CO_2 -Gehalt). Für einige Experimente wurden Mikrotiterplatten mit $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ anti-CD3-AK (αCD3) und anti-CD28-AK (αCD28) über Nacht bei 4°C beschichtet und anschließend dreimal mit PBS gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen. CD3 ist ein mit dem T-Zellrezeptor assoziiertes Protein und CD28 ist der Rezeptor für das ko-stimulatorische Signal (B7.1 und B7.2). Wenn der T-Zell-Rezeptor/CD3-Komplex durch einen Peptid-HLA-II-Komplex bzw. einen entsprechenden anti-CD3-AK aktiviert wird und zusätzlich CD28 durch B7 oder durch den hier benutzten CD28-Antikörper gebunden wird, führt dies zur Verstärkung der IL-2-Synthese, zur T-Zell-Proliferation und zur Entwicklung von T-Effektorzellen aus naiven T-Zellen (Janeway et al., 1999). Die Stimulation mit $\alpha\text{CD3}+\alpha\text{CD28}$ simuliert also eine Stimulation mit professionellen APC.

2.3.2. PBMC-Subgruppen

Die mittels MACS-Technik isolierten PBMC-Subgruppen wurden unter den gleichen Bedingungen wie die ungetrennten PBMC kultiviert. Die unterschiedlichen Subgruppen wurden mit jeweils einem der folgenden Stimuli aktiviert (Tabelle 2):

<i>Stimulus</i>	<i>T-Zellen (CD3⁺)</i>	<i>B-Zellen (CD19⁺)</i>	<i>Monozyten (CD14⁺)</i>
Spezifisch	1µg/ml PHA+20U/ml IL-2	2,5ng/ml IL4 und 1µg/ml anti-CD40-AK oder 0,01% SAC	50ng/ml LPS
Unspezifisch	10–1000IU IFN-β-1a	10–1000 IU IFN-β-1a	10–1000IU IFN-β-1a

Tabelle 2: Stimulation der PBMC-Subgruppen

2.3.3. Humane antigenspezifische T-Zelllinien

In dieser Studie wurden humane antigenspezifische CD4⁺-Lymphozytenlinien von MS-Patienten sowie von gesunden Kontrollindividuen verwendet. Die T-Zellen waren spezifisch gegen MBP, TT oder gegen BP.

Split-well-Technik:

Die antigenspezifischen T-Zelllinien wurden mittels eines modifizierten „split-well-Verfahrens“ etabliert (Zipp et al., 1997a). Dazu wurden 2×10^5 PBMC von gesunden Probanden mit einem Antigen (20pg/ml MBP oder 10µg/ml TT oder 5µg BP) in 200µl Kulturmedium in einer 96-well Mikrotiterplatte inkubiert. Nach sieben Tagen wurden 10U/ml rekombinantes humanes IL-2 als T-Zellstimulus zugeführt. Nach weiteren fünf bis sieben Tagen wurden jeweils 100µl Zellsuspension entnommen und auf je zwei Vertiefungen einer neuen Mikrotiterplatte verteilt (split-well). Anschließend wurden in An- und Abwesenheit von Antigen 1×10^5 autologe bestrahlte (3000 rad) PBMC zur Antigenpräsentation hinzugegeben. Zum Nachweis der Antigenspezifität wurde der Stimulationsindex (s.u.) als Maß für die Antigenspezifität errechnet. T-Zellpopulationen, die nach Antigenzugabe einen Stimulationsindex >3 aufwiesen, waren spezifisch für das jeweilige Antigen und wurden weiter kultiviert.

Die Th-Differenzierung der T-Zelllinien wurde anhand des Quotienten an IFN-γ und IL-4-Produktion bestimmt. Überwiegende IFN-γ-Färbung bei intrazellulärer Durchflusszytometrie (Zipp et al., 1998b) kennzeichnete eine Th1-Zelllinie; überwiegende IL-4 Färbung eine Th2-Linie und Doppelfärbung eine so genannte Th0-Linie (Lunemann et al., 2002).

Aktivierung der antigenspezifischen T-Zellen

Um eine Abhängigkeit der TRAIL- bzw. sCD95-Expression vom Funktionszustand der T-Zellen zu untersuchen, wurden Experimente mit aktivierten und nicht aktivierten T-Zellen einander gegenübergestellt. Dazu wurden zunächst 48-well-Zellkulturplatten mit α CD3+ α CD28 (10 μ g/ml in PBS) über Nacht bei 4°C beschichtet und anschließend mit PBS gewaschen. Zur Aktivierung wurden die T-Zellen ebenfalls gewaschen und in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in FCS-Medium aufgenommen. Pro beschichtetes well wurden 1×10^6 Zellen ausgesät. Nach 24h Inkubation ließ sich ein morphologischer Unterschied zwischen aktivierten und ruhenden T-Zellen feststellen.

Zusätzlich wurden T-Zellen auch mit Antigen und antigenpräsentierenden Zellen aktiviert. Dazu wurden $0,75 \times 10^6$ autologe bestrahlte (3000rad) PBMC zur Antigenpräsentation (APC) zusammen mit dem Antigen und 20U rekombinantem humanem IL-2 zu $0,25 \times 10^6$ antigenspezifischen T-Zellen gegeben. Als Alternative diente die Stimulation mit 1 μ g/ml PHA + 20U/ml IL-2.

2.3.4. Transformierte Zellen

Jurkat-Zellen sind Zellen eines humanen akuten lymphatischen T-Zell-Lymphoms (TIB-152, ATCC, Manassas, USA). Sie dienen in einigen Experimenten als Kontroll- oder Targetzellen. Die Kultur erfolgte in FCS-Medium.

2.4. ELISA

2.4.1. Allgemeines Prinzip

Die Bestimmung von sTRAIL und sCD95 sowie der Mediatoren IFN- γ und Interleukin-4 erfolgte mittels „sandwich“ Enzym-linked-immunoassay (ELISA).

Die Mikrotiterplatten der käuflich erworbenen ELISAs sind mit einem monoklonalen Antikörper gegen die zu untersuchende Substanz beschichtet (erster Antikörper). Zuerst wurden die Standardproben und die zu untersuchenden Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettiert und reagierten mit dem ersten Antikörper. Nach Abschluss der Reaktion wurden überschüssige Bestandteile der Proben durch Waschschrte entfernt. Nach Zugabe von Meerrettichperoxidase-markierten polyklonalen Antikörpern (zweiter Antikörper) konnte sich in einer anschließenden Inkubation ein Sandwich-Komplex aus dem ersten Antikörper, der zu untersuchenden Substanz in der Probe und dem enzymmarkierten zweiten Antikörper bilden. Überschüssiger enzymmarkierter

Antikörper wurde durch Waschen entfernt. Mit Zugabe der chromogenen Lösung (Tetramethylbenzidin) begann die Bildung eines farbigen Endproduktes, wobei die Farbintensität proportional der Menge der zu untersuchenden Substanz in der Probe oder in den Standardproben war. Diese Reaktion wurde durch Zugabe einer Säurelösung beendet. Anschließend wurde die Absorption des farbigen Endproduktes bei 450 nm gemessen und ausgewertet.

Durch das Mitführen von Standardproben bekannter Konzentration wurde eine Referenzgerade erstellt, mit der die Konzentration der Proben berechnet werden konnte. Der Leerwert, die Standardproben und die Proben wurden jeweils als Doppelwert gemessen.

2.4.2. Die Bestimmung von sTRAIL in Zellkulturüberständen

Die Bestimmung von humanem sTRAIL in Zellkulturüberständen und Serum erfolgte mittels eines ELISA (Soluble TRAIL/APO2L ELISA-Kit) von DIACLONE, Besancon, Frankreich.

Dazu wurden die Zellkulturplatten bei 500g für 10min zentrifugiert und jeweils 0,15ml der Überstände in Rundbodenplatten überführt und bei 700g für 10min erneut zentrifugiert. Nun wurden 100µl aus den Rundbodenplatten auf die vorbeschichteten Platten des TRAIL-ELISA überführt. Alle weiteren Schritte wurden nach der Durchführungsvorschrift des Herstellers vollzogen. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 450nm innerhalb von 30min mit einer Referenzwellenlänge von 620nm. Die Sensitivität dieses Testsystems liegt laut Hersteller bei 64pg/ml. Die Ergebnisse der Experimente dieser Studie gaben Hinweise, dass erst Werte über 90pg/ml als verlässlich zu betrachten sind.

2.4.3. Die Bestimmung von IFN-γ in Zellkulturüberständen

Die Bestimmung von humanem IFN-γ in Zellkulturüberständen erfolgte mittels des „Human Interferon Gamma ELISA-Kits“ der PBL Biomedical Laboratories, New Brunswick, USA. Die Zellkulturplatten wurden bei 500g für 10min zentrifugiert und jeweils 0,15ml der Überstände in Rundbodenplatten überführt und bei 700g für 10min erneut zentrifugiert. Nun wurden 100µl auf die vorbeschichteten Mikrotiterplatten des ELISA-Kits überführt. Alle weiteren Schritte wurden nach der Durchführungsvorschrift des Herstellers vollzogen. Die Sensitivität dieses Testsystems liegt laut Hersteller bei 10

– 500pg/ml. Der ELISA ist spezifisch für IFN- γ und hat keine Kreuzreaktionen mit IFN- α oder IFN- β .

2.4.4. Die Bestimmung von IL-4 in Zellkulturüberständen

Die Bestimmung von humanen IL-4 in Zellkulturüberständen erfolgte mittels des ELISAs Quantikine® der R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland. Die Überstände wurden nach dem gleichen Verfahren, wie oben beschrieben, gewonnen und es wurde 50 μ l Überstand pro Probe auf die Mikrotiterplatte gegeben. Die Durchführung erfolgte laut Herstellerangaben. Die Nachweisgrenze dieses Testsystems liegt laut Hersteller bei 10,0pg/ml.

2.4.5. Die Bestimmung von sCD95 im Zellkulturüberstand oder Serum

Konzentration der Zellkulturüberstände

Da die Konzentration von sCD95 in Zellkulturüberständen unter der Nachweisgrenze des ELISA-Kits lag, mussten die Zellkulturüberstände konzentriert werden. Zwei Verfahren wurden dazu getestet.

(a) Vakuumkonzentration

Kleine Flüssigkeitsmengen (bis zu 4ml) aus Proben mit nichtflüchtigen Substanzen in wässriger Lösung können mit einem Vakuumkonzentrator volumenreduziert werden. Mit einer Pumpe, die annähernd ein Vakuum erzeugte, wurden die Proben in einer temperierbaren Vakuumzentrifuge vom Lösungsmittel befreit. 24h vor der Durchführung des ELISA wurden die Pellets im Lösungspuffer des ELISA durch Vortexen gelöst. Die klaren Lösungen wurden auf die Mikrotiterplatte des ELISA aufgetragen.

(b) Azetonfällung

Proteine lassen sich mit Hilfe von Azeton aus einer Lösung fällen. Hierzu wurden die Überstände mit einer Eppendorf-Pipette, zentrifugiert und in ein neues 15ml Falcon-Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Überstände mit der fünffachen Volumenmenge an Azeton, welches zuvor auf -20°C abgekühlt wurde, gemischt. Diese

Suspension wurde für 15min bei -20°C inkubiert und anschließend bei 1500g für 15min zentrifugiert. Die Überstände wurden dekantiert und die Pellets über Nacht getrocknet. 24h vor der Durchführung des ELISA wurden die Pellets im Lösungspuffer des ELISA-Kits durch Vortexen gelöst. Die klaren Lösungen wurden auf die Mikrotiterplatte des ELISA aufgetragen.

Die Azetonfällung war, bei gleichen Ergebnissen, die einfachere Methode und wurde deswegen in den weiteren Experimenten angewandt (siehe Ergebnisse).

CD95 ELISA

Die Bestimmung von humanem sCD95 in Zellkulturüberständen und im Serum erfolgte mittels des sAPO-1/Fas ELISA, der zweiten Generation der Bender Medsystems Diagnostics GmbH, Wien, Österreich. Dieser ELISA erkennt alle bekannten CD95-Varianten. Die Zellkulturplatten (48-well Zellkulturplatten) wurden bei 500g für 10min abzentrifugiert und je 1ml der Überstände wurde in 1ml-Eppendorfgefäße überführt und bei 700g für 10min erneut zentrifugiert. Danach wurden die Zellkulturüberstände durch Azetonfällung konzentriert (1:10). Die Serumproben wurden nicht weiter behandelt. Der ELISA wurde gemäß den Richtlinien des Herstellers durchgeführt.

Die Sensitivität dieses Testsystems liegt laut Hersteller bei 20pg/ml. Das Testen von Leerwerten und internen Referenzwerten ergab jedoch, dass der ELISA erst ab einer sCD95-Konzentration von über 30pg/ml zuverlässig misst.

2.5. Durchflusszytometrie

2.5.1. Allgemeine Prinzipien

Die Durchflusszytometrie dient der Erfassung intra- oder extrazellulärer Proteine bzw. physikalischer und chemischer Eigenschaften von Zellen, welche sich in Suspension befinden und durch eine Messregion fließen. Sie ermöglicht es, quantitative multiparametrische Bestimmungen der Merkmale mehrerer Tausend Zellen pro Sekunde durchzuführen (Eckhardt, 1991). Das hier verwendete FACSCalibur® Durchflusszytometer saugt die Zellsuspension während der Messung an und führt sie in einem kontinuierlichen und nahezu laminaren Strom der Durchflusskammer zu. Diese enthält einen 480nm Argon-Laser und einen 630nm Diodenlaser. Die Analyse erfolgt nach dem Prinzip der angeregten Emission: tritt eine mit Fluoreszenzfarbstoff gekennzeichnete Zelle in den Laserstrahl ein, so werden diese Farbstoffe angeregt und

strahlen ein Emissionsspektrum mit einem charakteristischem Maximum aus:

- Fluoreszenz 1: proportional zur Farbintensität von Fluoreszin Isothiozyanat (FITC) mit einem Emissionsmaximum bei 520-530nm.
- Fluoreszenz 2: proportional zur Farbintensität von Phycoerythrin (PE) mit einem Emissionsmaximum bei 570-576nm.
- Fluoreszenz 3: proportional zur Farbintensität von Propidiumiodid (PI) mit einem Emissionsmaximum bei 495nm.

Zusätzlich analysiert das Durchflusszytometer physikalische Eigenschaften der Zellen anhand des von ihnen gestreuten Lichts. Je nach Anordnung der Streulichtdetektoren unterscheidet man zwischen nach vorne gestreutem Licht (Forward Scatter, FSC) und seitlich gestreutem Licht (Sideward Scatter, SSC):

- Der Detektor für FSC befindet sich in einem kleinen Winkel ($0,5 - 15^\circ$) zur Richtung des Laserstrahls. Mit FSC können Aussagen über die Zellgröße getroffen werden.
- Der Detektor für SSC ist in einem Winkel von 90° zur Achse des Laserstrahls ausgerichtet. SSC charakterisiert hauptsächlich die Granularisierung von Zellen.

In der Auswertung wird der Logarithmus der Fluoreszenz- und Streulichtimpulse berechnet und mit der Software CELLQuestTM graphisch dargestellt.

2.5.2. Voreinstellungen des Gerätes

Die Fluoreszenzeinstellungen des Geräts wurden regelmäßig mit „Calibrite-Beads“ der Firma Becton Dickinson kalibriert. Einen Störfaktor stellen Zelltrümmer (Debris) dar. Diese aus Erythrozyten- und Leukozytenfragmenten sowie Thrombozyten oder Immunkomplexen bestehenden Mikropartikel führen zu fehlerhaften Messergebnissen. Durch die Einstellung der Schwelle für FSC auf etwa zehn kann die Einbeziehung von Debris in die Auswertung verhindert werden (Ault und Mitchell, 1992).

2.5.3. Färbung und Kontrollen

Die Durchführung der Durchflusszytometrie umfasst folgende Schritte:

- Ernten der Zellen

- Blockieren unspezifischer Bindungen mit humanem IgG-AK
- Färben der Zellen (ein- oder mehrstufiges Verfahren)
- Einstellen des Durchflusszytometers
- Messen der Proben
- Auswertung der Messungen

Um die Zellen mit den oben angeführten Fluoreszenzfarbstoffen zu markieren, wurden spezifische monoklonale Antikörper gegen Oberflächen- oder intrazelluläre Antigene verwendet, die fest an die Zellen binden. Die PBMC-Subpopulationen wurden mit folgenden Antikörpern differenziert, die mit Fluoreszenzfarbstoff markiert waren:

- anti-CD3-AK, um T-Zellen zu identifizieren
- anti-CD19-AK, um B-Zellen zu identifizieren
- anti-CD14-AK, um Monozyten zu identifizieren

Diese Antikörper waren direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Für die Analyse der TRAIL-Expression auf der Oberfläche der Zellen wurden ungekoppelte Primärantikörper gegen TRAIL verwendet. Danach wurde mit einem gekoppelten Zweitantikörper inkubiert, der an den ersten bindet und das Signal visualisiert und amplifiziert.

Durch die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen mit unterschiedlichen Emissionsspektren kann man unterschiedliche Antigene gleichzeitig markieren und somit mehrere Teilpopulationen hinsichtlich ihrer Merkmale unterscheiden.

Zu jeder vollständigen Messreihe gehören geeignete Kontrollen:

- **Negativ-Kontrollen:**
 - *Eigenfluoreszenz:* Eine Fluoreszenzmessung mittels Durchflusszytometrie ist immer relativ. Da verschiedene Zellen unterschiedliche Eigenfluoreszenz haben, muss immer eine Negativ-Kontrolle (nicht gefärbte Probe) mitgeführt werden.
 - *Spezifitätskontrollen:* Eine Färbung mit einem Isotypenantikörper zu jedem eingesetzten spezifischen Antikörper, um die unspezifische Färbung, verursacht durch unspezifische Antikörperbindungen, von der gemessenen spezifischen zu subtrahieren.

- Kompensationskontrolle bei Doppelmarkierung:

Da immer eine geringfügige Grünfluoreszenz im Orange-Kanal und umgekehrt gemessen wird, muss dieser "Spillover" elektronisch kompensiert werden. Diese Kompensation nimmt man beim Messen anhand der Fluoreszenz von einfach gefärbten Proben vor. Bei Doppelmarkierung sind deshalb zwei Kontrollproben, die nur den einen oder den anderen Marker enthalten, mitzuführen.

- Positivkontrollen

Es empfiehlt sich, eine oder mehrere Positivkontrollen mitzuführen, d.h. Antikörper oder Antikörperkombinationen und Zellen, deren Resultat bekannt ist.

Fluoreszenzfarbstoffe, die nicht an Antikörper gekoppelt sind, wie das hier verwendete Propidiumiodid, können auch zur Markierung toter Zellen verwendet werden (s.u.).

2.5.4. Die Bestimmung der Reinheit der magnetisch separierten Zellen

Der Erfolg und die Reinheit der Leukozytenaufreinigung in T-, B-Zellen und Monozyten mit der MACS-Technik wurde durchflusszytometrisch kontrolliert. Bei der Vorbereitung der durchflusszytometrischen Messung wurden alle folgenden Schritte auf Eis oder bei 8°C durchgeführt. Alle Zentrifugationsvorgänge erfolgten bei 500g und 8°C für 10min. Ein Waschschritt bestand immer aus der Suspension der Zellen in FACS-Puffer und einer anschließenden Zentrifugation. Der Überstand wurde dekantiert.

In jedes FACS-Röhrchen wurden 2×10^5 Zellen gegeben und mit 1ml FACS-Puffer zweimal gewaschen. Die Zellpellets wurden nun mit 25µl FACS-Puffer als Kontrolle oder einer Lösung aus 2µl spezifischem Antikörper oder einem Isotypenantikörper und 23µl FACS-Puffer mit einer Multikanalpipette suspendiert und 30min im Dunkeln inkubiert. Folgende Antikörper bzw. Antikörperkombinationen wurden verwendet:

1. Keine (Hintergrund)
2. Isotyp anti-IgG1 PE und Isotyp anti-IgG1 FITC
3. Isotyp IgG2b PE und Isotyp anti-IgG1 FITC
4. Anti-CD3 PE (Marker für T-Zellen)
5. Anti-CD19 PE (Marker für B-Zellen)

6. Anti-CD14 PE (Marker für Monozyten)
7. Anti-CD45 FITC (Marker für Leukozyten)
8. Anti-CD3 PE und anti-CD45 FITC
9. Anti-CD19 PE und anti-CD45FITC
10. Anti-CD14 PE und anti-CD45 FITC

Danach wurden die Röhrchen direkt mit 1ml FACS-Puffer aufgefüllt, zentrifugiert und dekantiert. Das Pellet wurde in 300µl FACS-Puffer aufgelöst und die Suspension am Durchflusszytometer FACScalibur® gemessen und mit CELLQuest™ Software ausgewertet. Je nach Zellpopulation wurde in einer der Einzelfärbungen (3-5) und der äquivalenten Doppelfärbung (7-9) ein stark positives Signal und in den übrigen Einzelfärbungen (3-5) ein Signal gleich oder kleiner dem entsprechenden Isotyp (1-2) erwartet.

Um durch Erythrozytenverunreinigungen keine Ergebnisverfälschung zu erhalten, wurden nur die CD45-positiven-Zellen (Leukozyten) betrachtet. Die Werte wurden als „arbitrary units“ (au) dargestellt. Diese wurden aus der mittleren spezifischen Intensität des Fluoreszenzsignals der Färbung abzüglich der mittleren Intensität der Isotypenfärbung errechnet.

2.5.5. Die Bestimmung der TRAIL-Expression auf PBMC-Subgruppen

Für die Bestimmung der TRAIL-Expression auf den verschiedenen PBMC-Subgruppen wurde eine Dreifachfärbung verwendet. Ein ungekoppelter anti-TRAIL-AK und ein fluoreszenzmarkierter Zweitantikörper wurden mit einem direkt fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen ein Subgruppen-Oberflächenantigen sowie mit einer Propidiumiodidfärbung zum Ausschluss toter Zellen kombiniert. Das Färbeprotokoll war das folgende:

Die einzelnen Schritte wurden auf Eis oder bei 8°C durchgeführt. Alle Zentrifugationsvorgänge wurden bei 500g und 8°C für 10min ausgeführt. Ein Waschschrift bestand immer aus der Suspension der Zellen in 1ml FACS-Puffer und einer anschließenden Zentrifugation. Der Überstand wurde dekantiert.

Die Zellen wurden geerntet, einmal mit PBS gewaschen und für 10min mit humanem IgG inkubiert um unspezifisches Binden weiterer Antikörper zu verhindern. In jedes FACS-Röhrchen wurden 2×10^5 Zellen gegeben und nach einem Waschschrift mit 25µl

FACS-Puffer als Kontrolle oder spezifischem Maus-anti-TRAIL-AK in einer Konzentration von 10µg/ml oder einem Maus-IgG1-Isotypenantikörper der gleichen Konzentration für 15min bei 4°C inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurde mit einem FITC-markierten Ziege-anti-Maus-Zweitantikörper in einer Konzentration von 10µg/ml für 30min bei 8°C im Dunkeln inkubiert. Es folgten zwei Waschschriffe und anschließend die schon oben beschriebene Färbung der Subgruppenantigene mit PE markierten anti-CD3, anti-CD19 oder anti-CD14-AK bzw. deren Isotypen (allerdings ohne die korrespondierende anti-CD45-Färbung). Kurz vor der Analyse mit dem Durchflusszytometer wurde 1µg/ml Propidiumiodid zum Ausschluss toter Zellen als dritter Fluoreszenzfarbstoff zugegeben und die Probe gevortext.

2.5.6. Die Auswertung der erhobenen Daten

Die erhobenen Daten wurden mit Hilfe des Programms CELLQuest™ zunächst in einem Histogramm oder Dotplot dargestellt. Die gewünschte Population CD45⁺ (also Leukozyten) oder PI negativ und CD3⁺, CD19⁺ oder CD14⁺ wurde als „Region“ definiert. Eine Region ist eine Population von Zellen, die in Bezug auf ein Kriterium oder zwei Kriterien gewisse Eigenschaften erfüllen und auf dem Bildschirm als Bereich in Form einer Fläche (Dotplot) oder Strecke (Histogramm) dargestellt werden können. Diese Region wurde daraufhin in einem neuen Histogramm dargestellt und auf die übrige gewünschte Eigenschaft hin analysiert (Subgruppe, bzw. TRAIL-Expression). Dazu diente entweder der Mittelwert der spezifischen Färbung oder es wurden Marker gesetzt. Ein Marker kann in einem Histogramm willkürlich gesetzt werden und definiert einen unteren und oberen Grenzwert als Einschlusskriterium.

2.6. Zelltodnachweise

2.6.1. Prinzipien

Ob eine Zelle vital ist oder nicht (apoptotische Zellen, nekrotische Zellen, Debris) kann mit Farbstoff-Ausschlusstests nachgewiesen werden. Diese Tests basieren auf dem Prinzip, dass bestimmte Farbstoffe wie Trypanblau oder Propidiumiodid (PI) intakte Zellmembranen lebender Zellen nicht passieren können. Im Gegensatz dazu dringen diese Farbstoffe in tote Zellen ein und markieren diese.

2.6.2. Trypanblaufärbung

20µl einer Zellsuspension wurden 1:1 mit Trypanblau gemischt. Ein Tropfen dieser Lösung wurde auf ein Neubauer-Hämatocytophotometer appliziert. Tote Zellen färbten sich blau, wogegen lebende Zellen keinen Farbstoff aufnahmen. Die ungefärbten Zellen wurden unter einem binokularen Mikroskop gezählt.

Die Gesamtzahl lebender Zellen wurde folgendermaßen errechnet:

$$\text{Gesamtzahl lebender Zellen} = n \times df \times \text{vol.} \times 10^4$$

n: Anzahl der Zellen, gezählt in einem der vier Felder des Hämatocytophotometers

df: Verdünnungsfaktor, hier 2

vol.: Volumen, in dem die Zellen suspendiert wurden

Diese Prozedur wurde pro Zellsuspension zweimal durchgeführt, und es wurden zwei unabhängige Ansätze ausgezählt. Abschließend wurde der Mittelwert der errechneten Zellzahlen gebildet.

2.6.3. Propidiumiodidfärbung

Eine Propidiumiodid (PI)-Färbung wurde benutzt, um im FACS zwischen toten und lebenden Zellen zu unterscheiden. PI besitzt die Fähigkeit, mit doppelsträngiger Desoxyribonukleinsäure (DNA) zu interkalieren und bei Anregung durch UV-Licht zu fluoreszieren. Diese Fluoreszenz ist proportional dem Nukleinsäuregehalt der Zelle. Wie auch andere Farbstoffe kann PI keine intakten Zellmembranen passieren und färbt deshalb nur die DNA toter Zellen an.

PI wurde 1min vor der FACS-Analyse in einer Endkonzentration von 1µg/ml zu der Zellsuspension gegeben. Zellen die im FACS eine positive PI-Fluoreszenz zeigten, wurden ausgesiekt und nicht in die Datenauswertung mit einbezogen (s.o.).

2.6.4. DNA-Fragmentierung nach Nicoletti

Diese Methode ist eine Erweiterung der PI-Färbung. Durch die Färbung der DNA mit Propidiumiodid nach Nicoletti et al. (Nicoletti et al., 1991) lassen sich die einzelnen Zellzyklusphasen, bzw. die subG1-Populationen (apoptotische Zellen) identifizieren. Apoptotische Zellen, die sich in der subG1-Phase befinden, unterscheiden sich in ihrem

DNA-Gehalt deutlich von den übrigen Zellzyklusphasen, da während der Apoptose DNAsen DNA in Untereinheiten fragmentieren. Durch den Zusatz einer Lösung, die hypotone Detergenzien enthält, kommt es zum Herausdiffundieren der niedermolekularen DNA-Fragmente aus dem Zellkern in das Zytoplasma und durch die porös gewordene Zytoplasmamembran in den umgebenden Puffer. Somit kann man im Durchflusszytometer Zellen mit einem insgesamt erniedrigten DNA-Gehalt (hypodiploid) nachweisen (Loo und Rillema, 1998).

Zur Messung wurden die Zellen mit einer hypotonen Lösung mit 50 µg/ml Propidiumiodid, 0,1% Natriumzitat und 0,1% Triton X-100 für drei Stunden bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Der Anteil an Zellen mit fragmentierter DNA, definiert als hypodiploide Ereignisse in %, wurde mit dem Durchflusszytometer bestimmt und mit der CELLQuest™ Software ausgewertet.

2.7. Proliferationsnachweise

Die Bestimmung der DNA-Syntheseleistung anhand des Einbaus von radioaktiv markiertem Thymidin in die DNA stellt eine standardisierte Methode zur Quantifizierung der Zellproliferation dar. Bei der Zugabe einer definierten Menge [³H]Thymidin in das Kulturmedium einer konstanten Anzahl von Zellen pro Ansatz erhält man ein Maß für die Zellen, die sich in der S-Phase des Zellzyklus befinden, da an dieser Stelle der Einbau des markierten Basenanalogs in die DNA erfolgt.

Dazu wurden Zellen in einer Konzentration von 10⁶ Zellen/ml in FCS-Medium resuspendiert und in einer Flachbodenmikrotiterplatte ausplattiert. Die Zellen wurden parallel zu den Ansätzen für ELISA oder FACS-Analyse unterschiedlich stimuliert oder als Kontrolle belassen und im Brutschrank (37°C, 5% CO₂-Gehalt) inkubiert. Wenn nicht anders angegeben, wurde nach 80h in jede der Vertiefungen 0,5 µCi [³H]Thymidin zugegeben. Stimulierte T- und B-Zellen proliferierten und nahmen dabei das radioaktiv markierte Thymidin auf. Nach 16 h Inkubation wurde die Mikrotiterplatte eingefroren, um den [³H]Thymidin-Einbau zu stoppen und die Zellen zu lysieren. Mit Hilfe eines Zellerntegerätes (Cell Harvester) wurde der Inhalt der Mikrotiterplatte auf Filtermatten gesaugt. Nach Trocknen der Filter in einem Mikrowellengerät (160W, ca. 5min) wurde eine Feststoffsintillatorplatte auf diese Filter aufgeschmolzen. Schließlich konnten die abgekühlten Filter in einen Folienbeutel eingeschweißt und die Menge des [³H]Thymidins im Szintillationszähler gemessen werden. Alle Messungen wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt. Der Stimulationsindex (SI) wurde als Quotient aus

den radioaktiven Signalen pro Minute (cpm) von den stimulierten Zellkulturen und den Zellkulturkontrollen berechnet. Ein Stimulationsindex >3 wurde als positiv angesehen.

2.8. Statistische Auswertung

In der überwiegenden Zahl wurden Balkendiagramme zur Darstellung der Ergebnisse gewählt. Die Fehlerbalken über den Datenbalken beschreiben den Standardfehler des Mittelwertes („standarderror of the mean“, SEM).

Signifikanzprüfungen wurden mit dem *Mann-Whitney Rangsummen-Test* oder dem *Wilcoxon Test* durchgeführt. Der *Mann-Whitney Rangsummen-Test* ist ein nicht-parametrischer statistischer Test und beschreibt die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Unterschied zwischen zwei unabhängigen Gruppen beobachteter Unterschied auf Zufall beruht. Eine Normalverteilung in den Gruppen ist dabei nicht erforderlich.

Der *Wilcoxon Test* ist ein nicht-parametrischer statistischer Test und beschreibt die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Unterschied in einer Gruppe beobachteter Unterschied auf Zufall beruht. Eine Normalverteilung ist dabei ebenfalls nicht erforderlich. Dieser Test wurde bevorzugt zum Vergleich von Proteinexpressionen nach unterschiedlicher Stimulation von Zellen derselben Spender benutzt. Zum Vergleich von mehr als zwei Gruppen diente der *Kendall's W Test*.

Für die Proliferation von Zellen bzw. die Anzahl lebender Zellen in Kultur wurde hingegen eine Normalverteilung angenommen, so dass *Student T Tests* und *ANOVA-Methoden* zur statistischen Prüfung eingesetzt wurden. Soweit nicht anders angegeben wurden alle statistischen Hypothesen zweiseitig („two-tailed“) formuliert.

„*p*“ gibt dabei die Wahrscheinlichkeit an, mit der die Nullhypothese zu Unrecht verworfen wird. Üblicherweise gilt ein Unterschied als statistisch signifikant, d.h. mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht auf Zufall beruhend, wenn *p* Werte $< 0,05$ annimmt. Signifikante Unterschiede wurden in den Abbildungen mit „*“ gekennzeichnet.

Für Signifikanzprüfungen und das unten beschriebene „*growth curve modeling*“ wurde die Software SPSS 11.0 verwendet.

2.9. Verwendete Materialien

2.9.1. Zellkulturmedien und Puffer

<u>AB-Medium</u>	RPMI 1640 (Gibco-BRL, Karlsruhe) ad 100U/ml Penicillin (Gibco-BRL, Karlsruhe), 100µg/ml Streptomycin (Gibco-BRL, Karlsruhe), 5% gepooltes humanes AB-Serum
<u>FCS-Medium</u>	RPMI ad 2nM L-Glutamin (Gibco-BRL, Karlsruhe), 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 10% gepooltes fetales Kalbsserum (fetal calf serum, FCS)
<u>Waschmedium</u>	RPMI ad 2nM L-Glutamin, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 5% gepooltes FCS
<u>Serumfreies Medium</u>	AIM V (Gibco-BRL, Karlsruhe)
<u>Phosphatpuffer</u>	PBS (Gibco-BRL, Karlsruhe)

2.9.2. Substanzen für die PBMC und T-Zellkultur

Antigene

- Tetanustoxoid, TT (Allergon, Ängelholm, Schweden)
- Birkenpollen, BP (Allergon, Ängelholm, Schweden)
- Basisches Myelinprotein, MBP (Allergon, Ängelholm, Schweden)

Weitere Substanzen

- Interleukin-2, IL-2 (Eurocetus, Frankfurt)
- [³H]Thymidin (Amersham, Braunschweig)
- Anti-CD28 AK (Ancell, Bayport, USA)
- Anti-CD3-AK (OKT3, eigene Produktion)
- Phytohämagglutinin, PHA (Sigma, Steinheim)
- Maus-anti-CD40-AK (BD Pharmingen, San Diego, USA)
- humanes IL-4 (BD Pharmingen, San Diego, USA)
- Staphylokokkus Aureus Cowman Strain, SAC (ALEXIS, Grünberg, Deutschland)
- Lipopolysacharid, LPS (Sigma, Steinheim)
- IFN-β-1a (Serono, Unterschleißheim)

- TRAIL, humanes rekombinantes + Enhancer (Alexis, San Diego, CA)
- CD95L = APO-1-Antikörper mit Protein A (Dr. P.H. Krammer, DKFZ Heidelberg)

2.9.3. Substanzen für Magnetische Zelltrennung (MACS)

Trennpuffer

- PBS, 2mM EDTA, und 5% FCS

Microbeads

- CD3 Microbeads (Milteny, Bergisch Gladbach)
- CD19 Microbeads (Milteny, Bergisch Gladbach)
- CD14 Microbeads (Milteny, Bergisch Gladbach)

2.9.4. Substanzen für die Durchflusszytometrie

FACS-Puffer

- PBS, 0.5% BSA (bovines Rinderserum)

Gekoppelte Antikörper

- PE markierter Maus IgG1 anti-CD3-AK (BD Bioscience, San Jose, USA)
- PE markierter Maus IgG1 anti-CD19-AK (BD Bioscience, San Jose, USA)
- PE markierter Maus IgG2a anti-CD14-AK (BD Bioscience, San Jose, USA)
- Unspezifischer Maus IgG1 AK als Isotyp (BD Bioscience, San Jose, USA)
- Unspezifischer Maus IgG2a AK als Isotyp (BD Bioscience, San Jose, USA)

Primärantikörper

- monoklonale Maus IgG1 anti-TRAIL-AK (5D%, Alexis, Grünberg)
- unspezifischer Maus IgG1 AK als Isotyp (X0931, Dako, Glostrup, Dänemark)

Sekundärantikörper

- FITC-markierter Ziege anti-Maus-AK (Dianova, Hamburg)

2.9.5. Substanzen zum Nachweis von Zelltod

- Propidiumiodid (Sigma, Deisenhofen)
- Trypanblau (Sigma, Deisenhofen)
- Natriumzitrat (Sigma, Deisenhofen)
- Triton X-100 (Sigma, Deisenhofen)
- CD95L (APO-1 IgG3 Antikörper 1µg/ml) mit 10ng/ml Protein A (Trauth et al., 1989)

2.9.6. Verwendete Geräte

- Szintillationszähler (Beckman, USA)
- β-Zähler 1450 Microbeta TRILUX (Wallac, Turku, Finnland)
- Zell-Erntegerät Inotech Cell Harvester System (Inotech AG Dottikon, Schweiz)
- Bestrahlungsgerät: IBL 437C, Isotop: 137 Cs (CIS bio International)
- Photometer (Dynatech, Burlington, USA)
- FACScalibur® (Becton Dickinson, Mountain View, USA)
- MiniMACS (Milteny, Bergisch Gladbach)
- MS Säulen (Milteny, Bergisch Gladbach)
- Zentrifuge: Heraeus Megafuge 1.0R (Kendro Laboratory Products, Langenselbold)
- Sicherheitswerkbank Herasafe (Kendro Laboratory Products, Langenselbold)
- Vakuumentrockner SpeedVac Univapo 100H (Uniequip, Martinsried)
- Mikroskop (Zeiss Mikroskop Standard, Carl Zeiss, Oberkochen)
- Neubauer-Hämatocytozometer (Tiefe 0,10mm, Volumen 0,10 mm³; GLW, Würzburg)

2.9.7. Verbrauchsmaterialien

- Falcon-Röhrchen (Fassungsvermögen 50ml, Falcon)
- 96-well Mikrotiterplatten (Greiner)
- 24-well Mikrotiterplatten (Falcon)
- Ein- und Mehrkanalpipetten (Eppendorf, Wessling-Berzdorf)
- Pipettenspitzen (Eppendorf, Wessling-Berzdorf)
- FACS-Messröhrchen 12x75 mm-Falcon-Röhrchen aus Polystyrol (Falcon)

- Zellfilter (Milipore, Eschborn)

2.9.8. Verwendete Software

- ONE-Dscan (Scanalytics, Fairfax, Kanada)
- CELLQuest™ (Becton Dickinson, Mountain View, USA)
- SigmaStat (Sigma)
- SPSS 11.0 für Windows (SPSS, Chicago, USA)

3. Ergebnisse

3.1. Die Expression und Regulation von TRAIL

3.1.1. Vorexperimente - Lösliches TRAIL im Zellkulturüberstand von stimulierten PBMC

Lösliches TRAIL (sTRAIL) wurde im Serum von 20 gesunden Probanden mit einem käuflich erhältlichen TRAIL-ELISA bestimmt. Die mittlere sTRAIL-Serumkonzentration betrug $1351,8 \pm 203,7$ pg/ml (Mittelwert \pm SEM = Standard Error of the Mean).

Um die Herkunft von sTRAIL in humanem Serum zu bestimmen, wurden frisch isolierte humane PBMC kultiviert. Als Kulturmedium diente FCS-Medium, da ein Vorexperiment ergeben hatte, dass AB-Medium bereits sTRAIL enthält (Abb. 4).

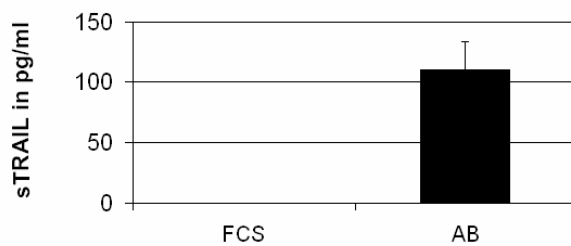


Abbildung 4: Lösliches TRAIL (sTRAIL) im ELISA – Hintergrund durch Zellkulturmedien. FCS-Medium oder AB-Medium wurden in drei unterschiedlichen ELISA-Ansätzen entsprechend dem Standardprotokoll jeweils als Doppelwert gemessen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert mit SEM (Standard Error of the Mean) dargestellt.

Die frisch isolierten PBMC wurden nun mit verschiedenen Agenzien versetzt, die T-Zellen, B-Zellen oder Monozyten stimulieren. Dabei dienten $1\mu\text{g/ml}$ PHA + 20U/ml IL-2, $1\mu\text{g/ml}$ PHA oder anti-CD3-AK (αCD3) + anti-CD28-AK (αCD28) + 20U/ml IL-2 als T-Zell-Stimuli (Greaves et al., 1974); $1\mu\text{g/ml}$ anti-CD40-AK (αCD40) + $2,5\text{ng/ml}$ IL-4 oder 0,01% SAC als B-Zell-Aktivierung (Jeppson et al., 1998; Li et al., 1997) und 50ng/ml LPS (Langstein et al., 2000) als Monozyten-Stimulus (siehe Material und Methoden für genaue Bedingungen). Im Vergleich dazu wurden 10 – 1000 IU/ml IFN- β -1a als unspezifischer Stimulus verwendet. IFN- β kann auf alle drei Zelltypen wirken, da die entsprechenden Rezeptoren ubiquitär exprimiert werden (Oritani et al., 2001).

Die Inkubation erfolgte im Brutschrank (37°C , 5% CO_2 -Gehalt) in getrennten Ansätzen für die Proteinbestimmung, die Bestimmung der Zellzahl und der Stimulationsindizes.

Nach 72h wurden die Proben zentrifugiert, die Überstände abgetrennt und die Menge an sTRAIL in einem sandwich-ELISA nachgewiesen. Unter Berücksichtigung der Nachweisgrenze (Detektionslimit, in den Grafiken abgekürzt als DL) des ELISA-Kits und unter Berücksichtigung des Standardfehlers konnte gezeigt werden (Abb. 5), dass sTRAIL vor allem nach Stimulation mit spezifischen T-Zell-Stimuli und nach der Stimulation mit SAC oder IFN- β von den PBMC sezerniert wird (Wilcoxon Test gegenüber Leerwert jeweils $p < 0,05$).

Dabei war zu beobachten, dass die T-Zell-Stimuli PHA und α CD3+ α CD28 unbedingt einer Kombination mit IL-2 bedurften, um eine sTRAIL-Sekretion zu induzieren. Stimulation mit PHA allein zeigte keinen Effekt. Die Wirkung von IFN- β war dosisabhängig (Kendall's W Test: $p < 0,05$). Eine Konzentration von 10 IU/ml IFN- β induzierte eine kaum messbare Sekretion. Eine Konzentration von 100 IU/ml hatte einen mittelstarken Effekt, vergleichbar dem T-Zell-Stimulus PHA+IL-2 (Wilcoxon Test: $p > 0,01$), und eine Konzentration von 1000 IU/ml IFN- β bewirkte eine sehr starke Sekretion von sTRAIL innerhalb von 72h (Abb. 5). Parallel zu den oben beschriebenen Protein-Bestimmungen wurden Proliferationsdaten und Zellzahlen erhoben. Die Proliferation wurde gemessen, indem nach 80h [3 H]Thymidin für weitere 16h zu den

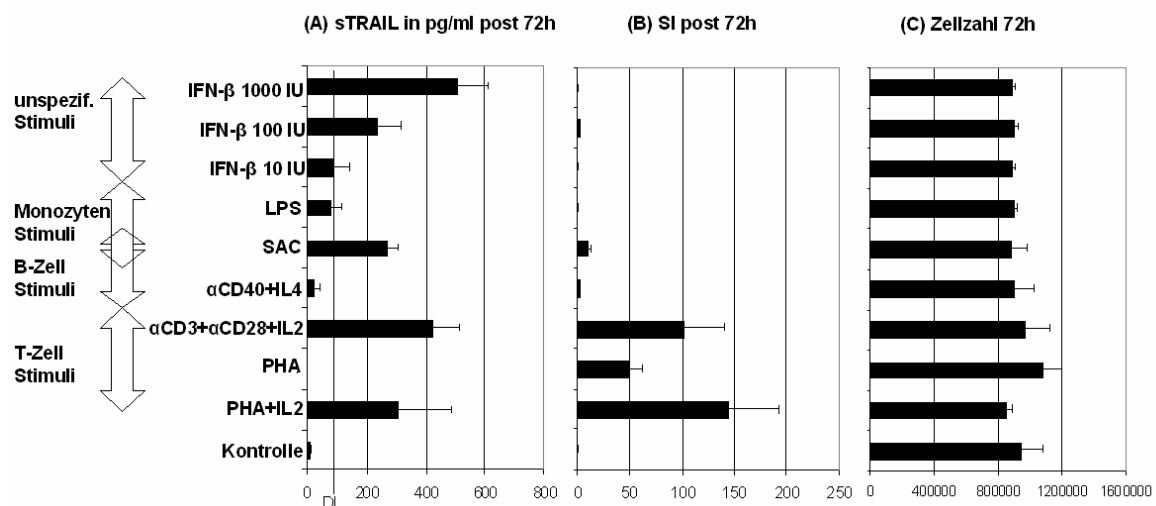


Abbildung 5: sTRAIL im Überstand von PBMC nach 72h unter verschiedenen Stimuli

- Lösliches TRAIL in den Zellkulturüberständen in pg/ml nach 72h. Dargestellt sind die Mittelwerte und SEM von PBMC-Kulturen von jeweils 6-8 gesunden Probanden. Die ELISA-Nachweisgrenze ist mit DL (Detektionslimit) angegeben.
- Stimulationsindex bestimmt mit [3 H]Thymidin. Dargestellt sind die Mittelwerte und SEM von PBMC-Kulturen derselben 6-8 gesunden Probanden.
- Anzahl an lebenden Zellen in den Zellkulturen nach 72h. Dargestellt sind die Mittelwerte und SEM in Zellzahl/ml von PBMC-Kulturen derselben 6-8 gesunden Probanden.

Zellkulturen hinzugegeben wurde. Die Stimulationsindizes zeigten deutlich, dass DNA 80-96h nach Beginn der Stimulation mit T-Zell-Stimuli und SAC repliziert wurde (SI 40-190 und 20). Unabhängig davon wurde die Anzahl lebender PBMC nach 72h mit der Trypanblaumethode bestimmt. Weder der Vergleich der Zellzahlen in den Kulturen (Zellzahl N/ml) zu Anfang und nach 72h, noch der Vergleich der Kontrollen mit den stimulierten Kulturen zeigte signifikante Unterschiede (ANOVA und Tukey-Kramer Multiple Comparisons Tests: $p>0,1$).

3.1.2. Regulation durch zellspezifische Stimuli

3.1.2.1 Lösliches TRAIL

Der Effekt von zellspezifischen Stimuli auf die Sekretion von sTRAIL durch PBMC

Die Kinetik der sTRAIL-Sekretion mit zellspezifischen Stimuli, gemessen als TRAIL-Konzentration im Überstand von PBMC-Kulturen über drei Tage, bestätigte die oben beschriebenen Ergebnisse (Abb. 6). Frisch isolierte PBMC von sechs gesunden Probanden wurden in An- und Abwesenheit von PHA+IL-2, α CD40+IL-4, oder LPS kultiviert. sTRAIL wurde im Medium (Zeitpunkt 0h) und in den Überständen (Zeitpunkte 24, 48 und 72h) mit dem sandwich-ELISA bestimmt. Nur die Stimulation mit T-Zell-Stimuli (PHA+IL-2) führte zu einem langsamen und nach 72h signifikanten Anstieg der sTRAIL-Konzentration, wogegen α CD40+IL-4 als B-Zell- und LPS als Monozyten-Stimulus keinen Effekt zeigten.

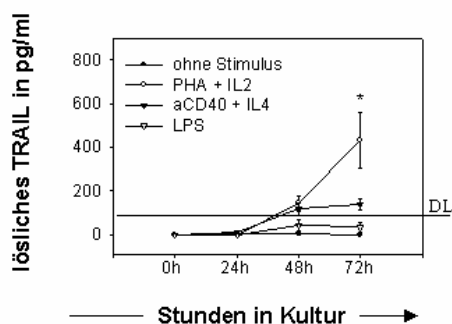


Abbildung 6: Kinetik der Konzentrationen von sTRAIL im Überstand von PBMC stimuliert mit zellspezifischen Stimuli. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 6 gesunden Probanden. Die Signifikanz wurde mit dem Wilcoxon Test (* $P<0,05$) geprüft.

Der Effekt von zellspezifischen Stimuli auf die Sekretion von sTRAIL durch isolierte T-Zellen, B-Zellen und Monozyten

Die oben beschriebenen Ergebnisse sollten nun mit isolierten reinen Leukozyten-Subpopulationen verifiziert werden. Dazu wurden frisch isolierte PBMC von vier gesunden Probanden durch magnetische Zellsortierung (MACS) mit Antikörpern gegen das jeweilige spezifische CD-Gruppenantigen in T-Zellen ($CD3^+$ Zellen), B-Zellen ($CD19^+$ Zellen) und Monozyten ($CD14^+$ Zellen) aufgetrennt. Die Reinheit wurde mittels Durchflusszytometrie geprüft und betrug für alle Subpopulationen $>96\%$. Die Subpopulationen wurden unter den gleichen Bedingungen wie die PBMC kultiviert und stimuliert, d.h. gereinigte T-Zellen wurden mit PHA+IL-2, B-Zellen mit $\alpha CD40$ +IL-4 und Monozyten mit LPS versetzt. sTRAIL wurde mit dem sandwich-ELISA-Kit im Medium (Zeitpunkt 0h) und den Überständen (Zeitpunkte 24, 48, und 72h) bestimmt. In Übereinstimmung mit den Vorexperimenten führte die Stimulation von reinen T-Zellen mit PHA+IL-2 zu einem langsamen Anstieg der Konzentration an sTRAIL in den Zellkulturüberständen (Abb. 7). Genauso konnte in den mit $\alpha CD40$ +IL-4 stimulierten B-Zell-Kulturen an keinem der Zeitpunkte (0, 24, 48 und 72h) sTRAIL nachgewiesen werden. Abbildung 7 zeigt auch, dass in den mit LPS stimulierten Monozyten-Kulturen nicht signifikante Mengen an sTRAIL an den ersten beiden Tagen nachgewiesen wurden, die aber nach 72h nicht mehr messbar waren.

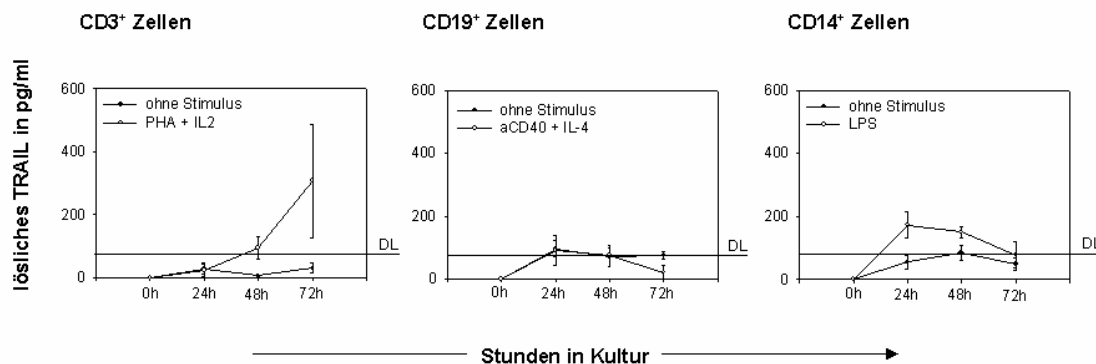


Abbildung 7: Kinetik der Konzentration von sTRAIL im Zellkulturüberstand von magnetisch getrennten PBMC-Subgruppen nach Stimulation mit zellspezifischen Stimuli. Die Mittelwerte \pm SEM von T-, B-Zellen und Monozyten von 4 gesunden Probanden nach 0, 24, 48 und 72h sind dargestellt.

Bestimmung von sTRAIL im Überstand von T-Zelllinien

Die Fähigkeit stimulierter T-Zellen, sTRAIL zu sezernieren, konnte auch mit antigenspezifischen T-Zelllinien bestätigt werden (Abb. 8). Mit Hilfe eines „split-well-Verfahren“ wurden MBP-spezifische T-Zelllinien von vier gesunden Probanden

gewonnenen (siehe Material und Methoden für Details), die nach dem gleichen Muster wie die magnetisch separierten T-Zellen mit PHA+IL-2 stimuliert wurden. In einem zusätzlichen Ansatz wurde eine antigenspezifische Stimulation mit 20pg/ml MBP+IL-2 und bestrahlten antigenpräsentierende Zellen (APC) vorgenommen. Dazu wurden $2,5 \times 10^5$ T-Zellen mit $7,5 \times 10^5$ bestrahlten (3000 rad) autologen PBMC als APC versetzt. Nach 72h wurde sTRAIL mit einem ELISA-Kit gemessen. Zusätzlich wurde nach 80h für weitere 16h die Proliferation als Stimulationsindex (SI) mit [3 H]Thymidin bestimmt. Es zeigte sich in beiden Fällen eine hohe sTRAIL-Sekretion und Zellproliferation nach 72h bzw. 80h (Der Wilcoxon Test im Vergleich zu den nicht stimulierten Ansätzen ergab: $p < 0,05$). Wenn nur APC ohne Antigen zur Kultur gegeben wurden, fand keine sTRAIL-Sekretion statt. Die in den T-Zell-Kulturüberständen gemessenen sTRAIL-Konzentrationen entsprachen ungefähr den im menschlichen Serum gemessenen sTRAIL-Konzentrationen. Als Kontrolle dienten zusätzlich zum Leerwert auch Überstände von T-Zell-Kulturen, die mit den nicht-adäquaten Stimuli SAC und LPS kultiviert worden waren. Diese Stimuli induzierten weder Zellproliferation noch die Sekretion von sTRAIL.

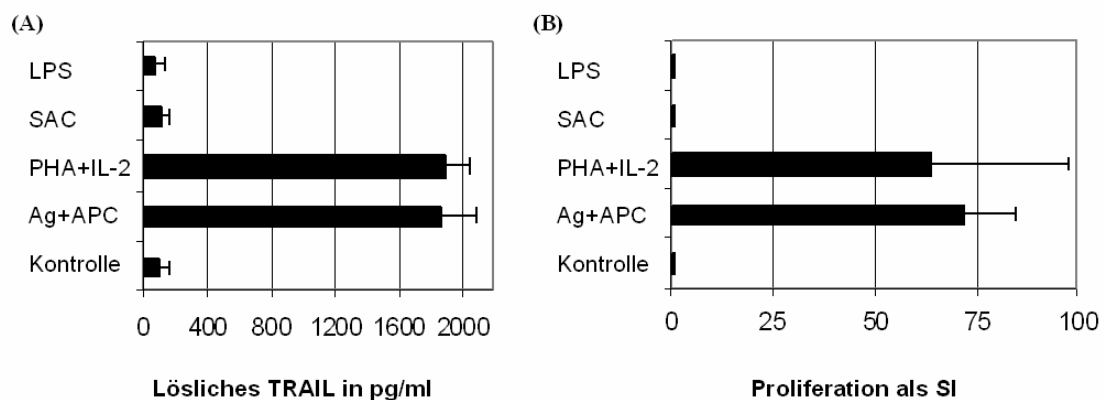


Abbildung 8: sTRAIL im Zellkulturüberstand von 4 antigenspezifischen T-Zelllinien nach 72h mit verschiedenen adäquaten (Antigen+APC+IL-2, PHA+IL-2) und nicht-adäquaten (SAC, LPS) Stimuli.

- A) Konzentration von sTRAIL in pg/ml. Dargestellt sind die Mittelwerte und SEM von jeweils 4 MBP-spezifischen T-Zelllinien gesunder Probanden
- B) Stimulationsindex (SI) bestimmt mit der [3 H]Thymidin-Methode.

3.1.2.2 *Membranständiges TRAIL*

Der Effekt von zellspezifischen Stimuli auf die Expression von membranständigem TRAIL auf T-Zellen, B-Zellen und Monozyten

Interessant erschien die Frage, ob membranständiges TRAIL genauso reguliert wird wie sTRAIL. Deshalb wurde membranständiges TRAIL auf T-Zellen, B-Zellen und Monozyten bestimmt. Die PBMC wurden dazu nicht magnetisch getrennt, sondern im Drei-Farben-Durchflusszytometer anhand ihrer Marker differenziert: Frisch isolierte PBMC von sechs verschiedenen gesunden Probanden wurden unter den gleichen Bedingungen, wie oben beschrieben, kultiviert und stimuliert. Membranständiges TRAIL wurde auf frisch isolierten (0h) oder kultivierten PBMC (24, 48 oder 72h) im Durchflusszytometer identifiziert, wobei die Zellen gleichzeitig anhand der spezifischen CD-Antigene einer Leukozytensubpopulation zugeordnet wurden (anti-CD3-AK für T-Zellen, anti-CD19-AK für B-Zellen und anti-CD14-AK für Monozyten). Tote Zellen wurden durch Propidiumiodidanreicherung erkannt und aus der Analyse ausgeschlossen. Von jeder Leukozytensubgruppe wurden 5000 lebende (Propidiumiodid-negative) Zellen untersucht. Abbildung 9A und 9B zeigen eine Hintergrundexpression von membranständigem TRAIL auf T-Zellen, welche im Verlauf langsam weiter anstieg. Die Expression zum Zeitpunkt 0h und zu allen weiteren Zeitpunkten war die gleiche in den unstimulierten Kontrollen und den mit PHA+IL-2 versetzten Proben (Abb. 9, Wilcoxon Teste: $p > 0,1$). Auf der Oberfläche von B-Zellen konnte TRAIL weder ex vivo noch in Kultur oder unter Stimulation mit α CD40+IL-4 nachgewiesen werden. Ähnlich den T-Zellen zeigten Monozyten bereits ex vivo eine TRAIL-Expression auf der Zelloberfläche. Diese stieg im Verlauf weiter an, doch auch hier wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollen und den mit LPS stimulierten Ansätzen zu keinem der Messzeitpunkte gefunden (Wilcoxon Teste: $p > 0,01$). Somit konnte die Expression von membranständigem TRAIL auf keiner der untersuchten Leukozytengruppen mit den hier getesteten zellspezifischen Stimuli verstärkt werden.

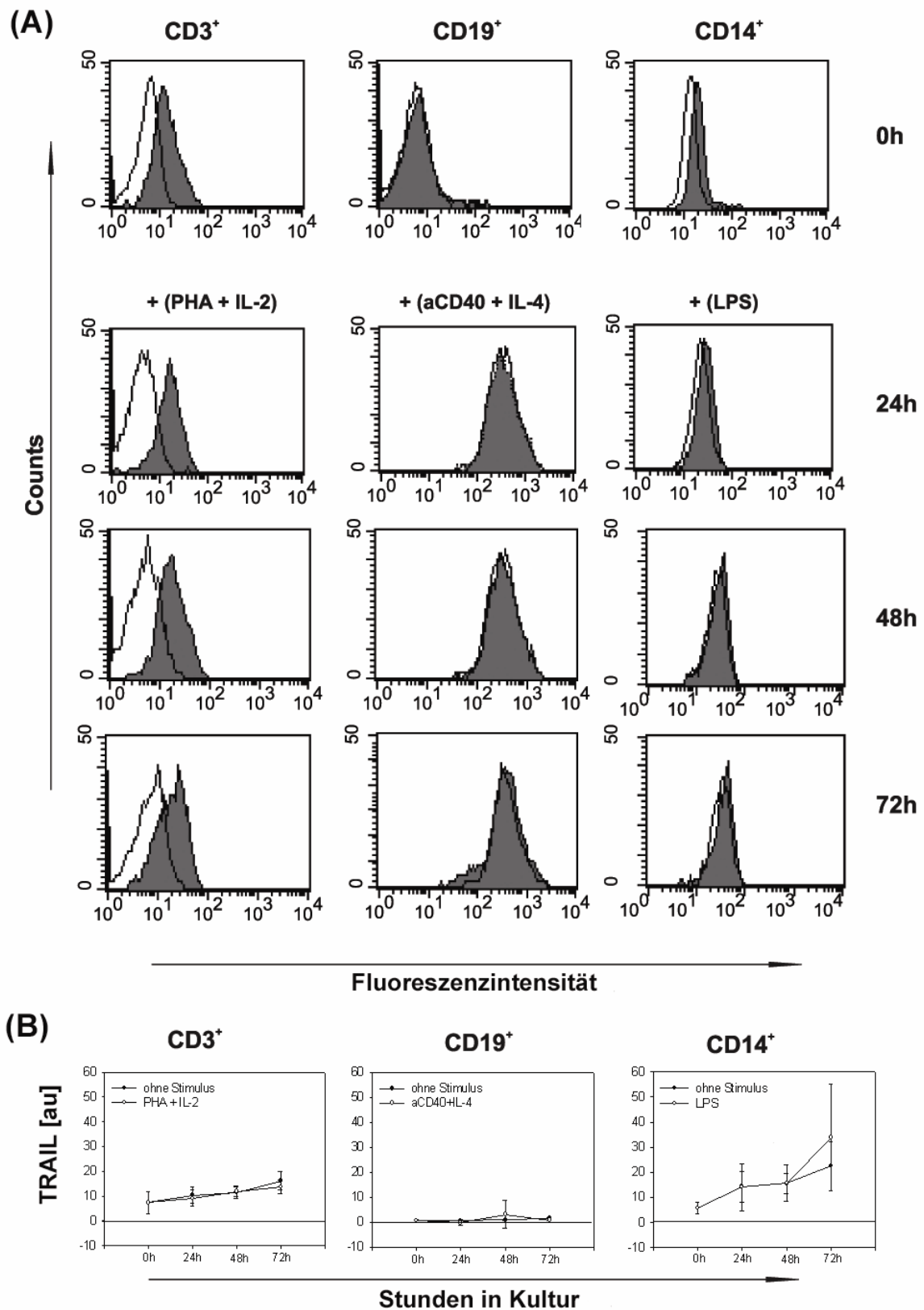


Abbildung 9: Expression von membranständigem TRAIL auf T-Zellen, B-Zellen und Monozyten nach Aktivierung mit zellspezifischen Stimuli.

A) Membranständige TRAIL-Expression des stimulierten Ansatzes (gefülltes Histogramm) ist gegen die korrespondierende Isotypenfärbung (leeres Histogramm) aufgezeichnet. Jedes Histogramm zeigt die

TRAIL-Expression einer stimulierten Leukozyten-Subgruppe zu einem der vier Zeitpunkte.

- B) *Membranständige TRAIL-Expression im Vergleich zwischen stimulierten und unstimulierten Zellproben in arbitrary units (au). Arbitrary units wurden aus den Histogrammstatistiken berechnet und als mittlere Fluoreszenzstärke der TRAIL-Färbung minus der Isotypenfärbung definiert. Die Punkte und Linien repräsentieren den Mittelwert und SEM von 6 verschiedenen Probanden.*

3.1.3. Regulation durch IFN- β

3.1.3.1 Lösliches TRAIL

Der Effekt von IFN- β auf die Sekretion von sTRAIL durch isolierte T-Zellen, B-Zellen und Monozyten

Schon die Vorexperimente hatten gezeigt, dass PBMC auch nach Stimulation mit IFN- β sTRAIL sezernieren. Eine Kinetik über drei Tage mit IFN- β -Konzentrationen von 10-1000 IU (Abb. 10), bestätigte die Fähigkeit von IFN- β , eine starke sTRAIL-Sekretion zu induzieren: Frisch isolierte PBMC von sechs gesunden Probanden wurden in An- und Abwesenheit von 10, 100 oder 1000 IU IFN- β -1a kultiviert. sTRAIL wurde zu den verschiedenen Zeitpunkten im Medium (Zeitpunkt 0h) oder den Zellkulturüberständen (Zeitpunkte 24, 48 und 72h) mit dem TRAIL-sandwich-ELISA bestimmt. Die Sekretion von sTRAIL war dosisabhängig, erfolgte bei Stimulation mit der höchsten Konzentration von 1000 IU schon in den ersten 24h in großen Mengen und erreichte sehr hohe Konzentrationen.

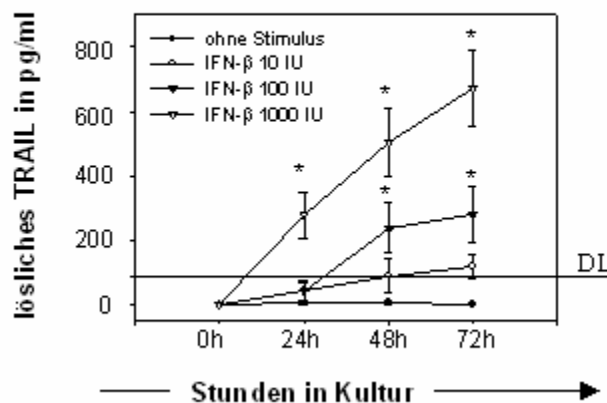


Abbildung 10: sTRAIL im Überstand von PBMC nach Stimulation mit IFN- β im Verlauf. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 6 gesunden Probanden. Die Signifikanz wurde jeweils mit dem Wilcoxon Test (* $P < 0,05$) geprüft.

Um die Zellpopulation zu bestimmen, in der sich durch IFN- β -Stimulation eine sTRAIL-Sekretion induzieren lässt, wurden die PBMC von vier gesunden Probanden erneut

magnetisch in T- (CD3⁺), B-Zellen (CD19⁺) und Monozyten (CD14⁺) separiert und getrennt kultiviert. Die Zellen wurden mit 10, 100 oder 1000 IU IFN- β -1a stimuliert oder als Kontrollen belassen. Medium (Zeitpunkt 0h) oder Überstände (Zeitpunkte 24, 48, und 72h) wurden aus jeweils verschiedenen Ansätzen zu diesen Zeitpunkten abgenommen, und sTRAIL wurde mit dem sandwich-ELISA bestimmt. Unerwarteterweise zeigten nur Monozyten eine sTRAIL-Sekretion nach Stimulation mit IFN- β . Deren Kinetik war vergleichbar mit dem PBMC-Ansatz, aber die sTRAIL-Spitzenkonzentrationen waren wesentlich höher (Abb. 11). In den Überständen von isolierten T- und B-Zellen, die mit IFN- β stimuliert worden waren, konnte kein sTRAIL nachgewiesen werden.

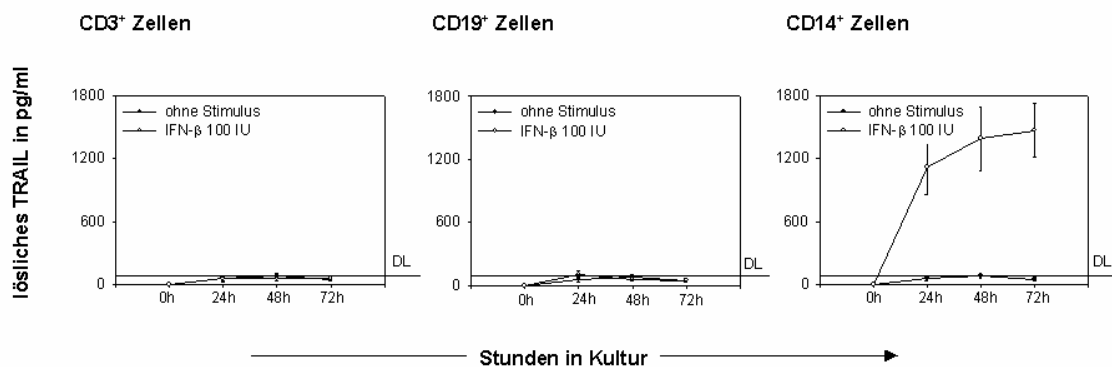


Abbildung 11: sTRAIL im Überstand von PBMC-Subgruppen nach magnetischer Zellseparation und Stimulation mit IFN- β im Verlauf. Die Mittelwerte \pm SEM von 4 gesunden Probanden sind dargestellt.

3.1.3.2 Membranständiges TRAIL

Der Effekt von IFN- β auf die Expression von membranständigem TRAIL auf T-, B-Zellen und Monozyten

Geht die Sekretion von sTRAIL nach Stimulation mit IFN- β mit einer Hochregulation von membranständigem TRAIL auf Monozyten einher? Um diese Frage zu beantworten wurde erneut eine durchflusszytometrische Analyse mit Dreifachfärbung durchgeführt. Dazu wurden frisch isolierte PBMC von sechs verschiedenen gesunden Probanden in An- und Abwesenheit von 100 IU IFN- β -1a kultiviert. Membranständiges TRAIL wurde auf je 5000 frisch isolierten (0h) oder kultivierten PBMC (24, 48 und 72h) einer Leukozytensubpopulation untersucht. Die Leukozytensubpopulationen wurden anhand ihrer spezifischen Subgruppenmarker (anti-CD3-AK für T-Zellen, anti-CD19-AK für B-Zellen und anti-CD14-AK für Monozyten) identifiziert und tote Zellen wurden durch Propidiumiodidanreicherung erkannt.

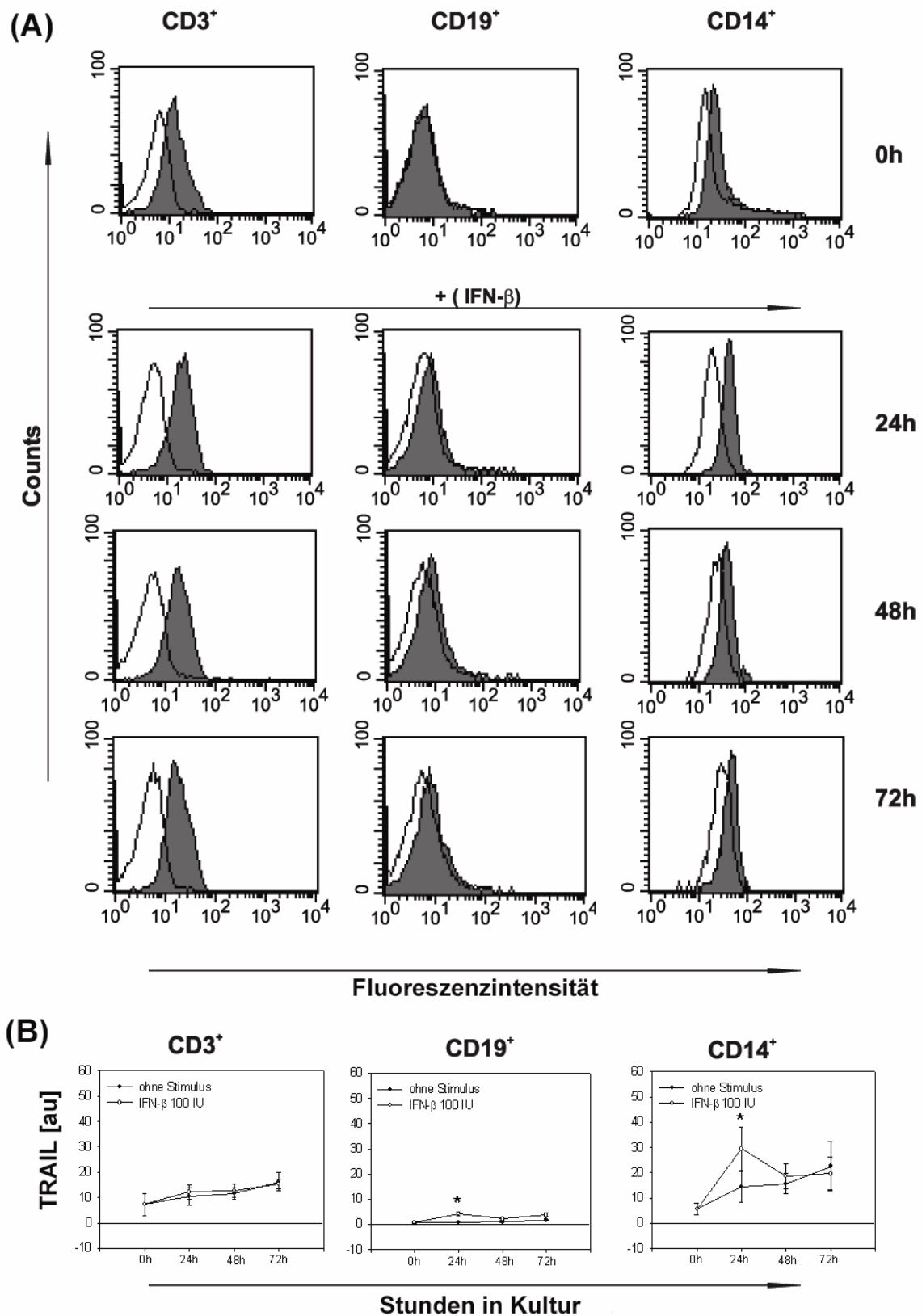


Abbildung 12: Expression von membranständigem TRAIL auf T-Zellen, B-Zellen oder Monozyten nach Stimulation mit IFN- β .

- A) Membranständige TRAIL-Expression des mit IFN- β stimulierten Ansatzes (gefülltes Histogramm) ist gegen die korrespondierende Isotypenfärbung (leeres Histogramm) aufgezeichnet. Jedes Histogramm zeigt die TRAIL-Expression einer stimulierten Leukozyten-Subgruppe zu einem der vier Zeitpunkte.
- B) Membranständige TRAIL-Expression im Vergleich zwischen stimulierten und unstimulierten

Zellproben in arbitrary units (au). Arbitrary units wurden aus den Histogrammstatistiken berechnet und als mittlere Fluoreszenzstärke der TRAIL-Färbung minus der Isotypenfärbung definiert. Die Punkte und Linien repräsentieren den Mittelwert und SEM von 6 verschiedenen Probanden ($P < 0.05$, Wilcoxon Test).*

IFN- β hatte keinen Effekt auf die Expression von membranständigem TRAIL bei T-Zellen, da sowohl auf der Oberfläche von Zellen, die mit IFN- β stimuliert waren, als auch auf der Oberfläche von Kontroll-T-Zellen gleich hohe Konzentrationen von TRAIL nachgewiesen wurden (Abb. 12, Wilcoxon Teste: $p > 0,1$). Dieses Ergebnis entspricht den Resultaten der Studien mit zellspezifischen Stimuli. Auf B-Zellen und Monozyten dagegen führte IFN- β nach 24h zu einer signifikanten Hochregulation von membranständigem TRAIL. Bei den B-Zellen war dieser Effekt verhältnismäßig gering ausgeprägt, aber dennoch signifikant im Vergleich zu den Kontrollen (Wilcoxon Teste: $p < 0,05$). Zu den späteren Zeitpunkten bestand sowohl bei den B-Zellen als auch bei den Monozyten kein Unterschied zwischen den stimulierten und unstimulierten Zellen. Die TRAIL-Expression auf Monozyten ex vivo (0h) war der Expression auf T-Zellen vergleichbar.

3.1.4. TRAIL-Sekretion, Zellproliferation und absolute Zellzahlen

Die eingesetzten zellspezifischen Stimuli PHA+IL-2 und α CD40+IL-4 regen T-Zellen bzw. B-Zellen zur Proliferation an (Greaves et al., 1974; Jeppson et al., 1998). Diese kann in der Regel erst nach mehr als 72h durch [3 H]Thymidin-Inkorporation bei der DNA-Replikation nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu sind Monozyten nach Stimulation mit LPS nicht zur Proliferation fähig (Langstein et al., 2000). Um eine erfolgreiche Stimulation von T- und B-Zellen zu dokumentieren, wurden Stimulations-Indizes (SI = Quotient der gemessenen Radioaktivität des stimulierten Ansatzes zur Aktivität des unstimulierten Ansatz) als Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten errechnet. Dazu wurden magnetisch getrennte T- und B-Zellen der vier selben gesunden Probanden genutzt. Die Proliferationsnachweise wurden parallel zu den Zellkulturen zur Proteinbestimmung durchgeführt. Ein SI $> 3,0$ wurde als Proliferation betrachtet.

Gleichzeitig sollte gezeigt werden, dass die im ELISA gemessenen erhöhten sTRAIL-Konzentrationen in den Überständen von T-Zellen wirklich auf deren erhöhte sTRAIL-Sekretion zurückzuführen war. Analog sollte gesichert werden, dass sTRAIL in den Überständen von stimulierten B-Zellen nicht nur deswegen nicht nachweisbar war, weil die absolute B-Zellzahl stark erniedrigt war. Deshalb wurde zusätzlich die Anzahl der in Kultur befindlichen lebenden Zellen zu jedem der vier Zeitpunkte der ELISA-

Messungen (0, 24, 48, 72h) bestimmt. Dafür wurden magnetisch gereinigte T- und B-Zellen derselben vier gesunden Probanden eingesetzt. Die Auszählung erfolgte blind mit der Trypanblaumethode in Neubauer-Hämatozytometern für jeden Spender, jede Zellgruppe und jeden eingesetzten Stimulus im Doppelwert.

Tabelle 3 zeigt Zellzahlen und SI von stimulierten und unstimulierten T- und B-Zellen. Es stellte sich heraus, dass die Anzahl lebender Zellen in den stimulierten Kulturen nach 24h bzw. 48h geringer und nach 72h sogar signifikant geringer war (ANOVA, Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test: $p < 0,05$) als die anfängliche Zellzahl. Vom Trend her war sie auch geringer als die Zellzahl in den Kontrollen. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen T- und B-Zellen oder zellspezifischen Stimuli (PHA, IL-2, PHA+IL-2, α CD40+IL-4) und IFN- β (ANOVA: $p > 0,05$). Erst zu späteren Zeitpunkten (s.u.) ergaben sich signifikant höhere Zellzahlen in den mit zellspezifischen Stimuli aktivierten B- und T-Zell-Kulturen. Die Funktionalität der zellspezifischen Stimuli konnte durch einen SI größer als drei und die typische Form aktivierter Zellen unter dem Lichtmikroskop nachgewiesen werden. IFN- β regte die Zellen nicht zur Proliferation an.


Subpopulation	Kulturbedingung	10 ⁶ Zellen/ml zu verschiedenen Zeitpunkten				SI [³ H]thymidine
						
		0h	24h	48h	72h	96h
T-Zellen	Kontrolle	1,00	0,95 \pm 0,05	0,94 \pm 0,04	0,82 \pm 0,09	1
	PHA+IL-2	1,00	0,71 \pm 0,07	0,76 \pm 0,03	0,58 \pm 0,05	356 \pm 175
	PHA	1,00	0,68 \pm 0,03	0,80 \pm 0,05	0,74 \pm 0,04	18 \pm 6
	IFN- β	1,00	0,84 \pm 0,08	0,86 \pm 0,04	0,75 \pm 0,03	2,1 \pm 0,06
B-Zellen	Kontrolle	1,00	0,73 \pm 0,07	0,81 \pm 0,06	0,73 \pm 0,03	1
	α CD40 + IL-4	1,00	0,65 \pm 0,05	0,70 \pm 0,03	0,64 \pm 0,03	9,3 \pm 1,8
	SAC	1,00	0,70 \pm 0,05	0,69 \pm 0,07	0,58 \pm 0,04	67 \pm 21
	IFN- β	1,00	0,81 \pm 0,07	0,69 \pm 0,05	0,63 \pm 0,02	1,6 \pm 0,3

Tabelle 3: Anzahl an lebenden Zellen nach 0, 24, 48 und 72h der verschiedenen PBMC-Subpopulationen von vier gesunden Probanden stimuliert mit unterschiedlichen Stimuli. Mittelwerte \pm SEM sind hier angegeben als Millionen Zellen pro ml. Zusätzlich ist die Proliferation derselben Zellen nach 72 als Stimulationsindex angegeben.

3.1.5. Die biologische Aktivität von sTRAIL aus Zellkulturüberständen

Die bisher präsentierten Ergebnisse belegen, dass CD3⁺ and CD14⁺ Zellen in der Lage sind, sTRAIL zu produzieren. In einem weiteren Schritt sollte nun gezeigt werden, dass

das in den Überständen nachgewiesene sTRAIL auch biologisch aktiv ist, d.h. Apoptose in suszeptiblen Zellen induzieren kann. Dazu wurden magnetisch gereinigte T-Zellen in An- und Abwesenheit von PHA+IL-2 sowie separierte Monozyten in An- und Abwesenheit von 10, 100 oder 1000 IU IFN- β für 48h und 72h kultiviert. Anschließend wurde geprüft, ob die gewonnenen Zellkulturüberstände Apoptose induzieren. Dazu diente ein DNA-Fragmentierungsnachweis im Durchflusszytometer nach Nicoletti (Nicoletti et al., 1991). 2×10^5 Jurkat-T-Lymphomzellen wurden in den verschiedenen gesammelten Zellkulturüberständen für 24h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in einer hypotonen fluorochromen Lösung (Propidiumiodid 50 $\mu\text{g/ml}$ in 0,1% Natriumzitrat und 0,1% Triton X-100) suspendiert. Nach drei Stunden wurde die DNA-Fragmentierung im Durchflusszytometer durch Messung der hypodiploiden DNA-Spitzen gemessen. Als Positivkontrolle diente CD95L (APO-1 1 $\mu\text{g/ml}$ mit Protein A

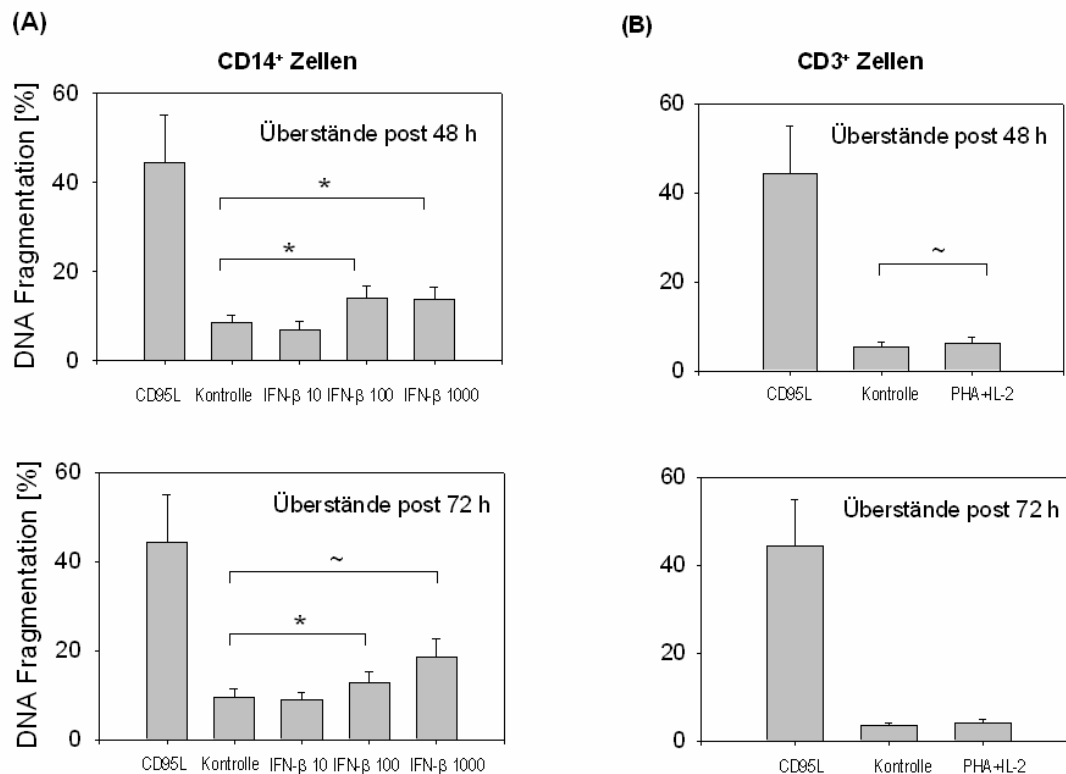


Abbildung 13: Nachweis der biologischen Aktivität von sTRAIL in Jurkat-Zellen mit einem DNA-Fragmentierungstest. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM der DNA-Fragmentierung in %.($*P < 0.05$, Wilcoxon Test).

10ng/ml), der Apoptose in Jurkat-Zellen auslöst (Trauth et al., 1989). Überstände von nicht stimulierten T-Zellen und Monozyten wurden als Negativkontrolle genutzt.

Abb. 13A zeigt, dass Überstände von Monozyten, die mit 100 IU oder 1000 IU IFN- β stimuliert wurden, Apoptose in Jurkat-Zellen auslösten. Der Anteil an apoptotischen Jurkat-Zellen nach Behandlung mit Zellkulturüberständen aus stimulierten T-Zell-Kulturen war sehr gering und nach 48h nur auf einem Niveau von $p < 0,1$ signifikant (Abb. 13B). Dies stimmt mit den wesentlich geringeren Konzentrationen von sTRAIL in den Überständen von stimulierten T-Zellen überein. Während Monozyten bis zu 2,0ng/ml sTRAIL in die Kulturüberstände abgaben, waren es in den T-Zell-Kulturen nur 0,3ng/ml.

3.2. Immunomodulatorische Wirkungen von TRAIL

3.2.1. Expression von löslichem oder membranständigem TRAIL im Vergleich zwischen MS-Patienten und gesunden Probanden

Wie in der Einleitung beschrieben, gibt es Hypothesen, die eine Mitwirkung des TRAIL-Systems in der Pathogenese der Multiplen Sklerose nahe legen. Deshalb wurden mögliche Unterschiede in der Expression von löslichem und membranständigem TRAIL in PBMC von Gesunden und MS-Kranken geprüft. Kryokonservierte PBMC von jeweils zehn gesunden Probanden und neun Patienten mit klinisch manifester aber nicht immunomodulatorisch behandelter RRMS wurden in FCS-Medium kultiviert und mit PHA+IL-2 oder 1000 IU IFN- β stimuliert. Nach 72h wurden die Überstände abgetrennt, zentrifugiert, und die Menge an sTRAIL wurde mit dem TRAIL-sandwich-ELISA bestimmt (Abb. 14A). Parallel dazu wurden PBMC von denselben Probanden für die Bestimmung der Oberflächenexpression von membranständigem TRAIL unter den gleichen Bedingungen für 48h kultiviert. Es wurden 10^4 Zellen pro Probe im Durchflusszytometer analysiert, wobei tote Zellen durch Propidiumiodidanreicherung erkannt und von der Analyse ausgeschlossen wurden (Abbildung 14B). Die Proliferation der PBMC wurde in einem dritten parallelen Ansatz für jeden Spender durch Zugabe von [^3H]Thymidin nach 80h und die Messung der Radioaktivität nach 86h nachgewiesen.

In Übereinstimmung mit den Vorexperimenten führte die Stimulation der PBMC mit IFN- β zu einer starken und mit PHA+IL-2 zu einer moderaten Sekretion von sTRAIL, wobei jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen gesunden Probanden und MS-Patienten nachweisbar waren (Mann-Whitney Rangsummen-Teste: $p > 0,5$). Allerdings ergab sich ein Trend für eine höhere sTRAIL Sekretion bei der IFN- β -Stimulation von

PBMC der gesunden Probanden (Mann-Whitney Rangsummen-Test: $p=0,09$). Hinsichtlich der TRAIL-Oberflächenexpression existierten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, unabhängig von der Art des Stimulus (Mann-Whitney Rangsummen-Teste: $p>0,1$). Die Funktionalität der Stimuli und der kryokonservierten PBMC konnte mit Proliferationstesten nachgewiesen werden, welche wiederum keine signifikanten Unterschiede zwischen der Proliferation der PBMC von gesunden Probanden und MS-Patienten zeigten (Proliferationsindex 79 ± 34 vs. 109 ± 39 , Paired Sample T-Test: $p>0,1$).

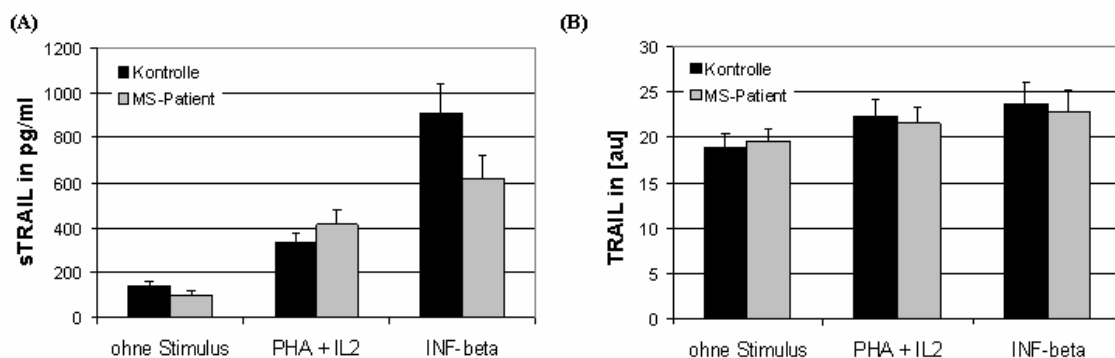


Abbildung 14: Vergleich der löslichen und membranständigen TRAIL-Expression zwischen PBMC von Gesunden (Kontrolle) und MS-Patienten. Die Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Rangsummen-Test (* $P<0,05$) geprüft.

- A) sTRAIL in pg/ml. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM
 B) Die mittlere Expression von membranständigem TRAIL der stimulierten und unstimulierten Ansätze ist mit SEM in arbitrary units (au) dargestellt. Arbitrary units wurden aus den Histogrammstatistiken berechnet und als mittlere Fluoreszenzintensität der TRAIL-Färbung minus mittlere Fluoreszenzintensität der Isotypenfärbung definiert.

3.2.2. Der Effekt von TRAIL auf die Proliferation von antigenspezifischen T-Zelllinien

TRAIL könnte neben seiner Funktion als apoptoseinduzierender Mediator auch weitere immunomodulatorische Wirkungen, z.B. durch ein Eingreifen in den Zellzyklus, besitzen. Deshalb wurde hier die Wirkung von TRAIL auf die Zellaktivierung untersucht. Dazu wurden sechs antigenspezifische T-Zelllinien mit α CD3+ α CD28 stimuliert und in An- und Abwesenheit von 300ng/ml humanen rekombinanten TRAIL in Verbindung mit einem Verstärker-Antikörper für die Multimerisation kultiviert. Die Proliferation wurde nach 72h durch die Inkubation mit [3 H]Thymidin über 16h jeweils als Dreifachwert gemessen. Abbildung 15 zeigt, dass die Proliferation der mit TRAIL behandelten stimulierten T-Zelllinien signifikant geringer war als die Proliferation in den nicht mit TRAIL behandelten T-Zelllinien (Paired Sample T-Test: $p<0,05$).

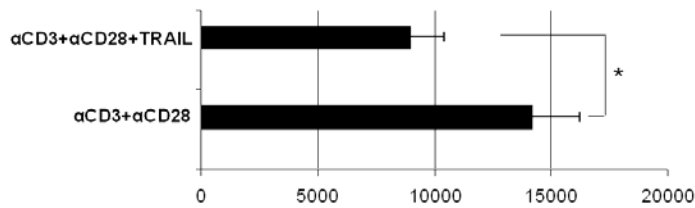


Abbildung 15: TRAIL (300ng/ml) inhibiert die Proliferation von humanen antigenspezifischen T-Zelllinien. Die Proliferation von 6 T-Zelllinien ist als Mittelwert \pm SEM der counts per minute (cpm) dargestellt. Die Signifikanz wurde mit dem Paired Sample T-Test (* $P < 0,05$) geprüft.

3.2.3. Der Effekt von TRAIL auf die Sekretion von INF- γ und IL-4 durch antigenspezifische T-Zelllinien

Neben der Wirkung von TRAIL auf die Proliferation von T-Zellen ist auch eine Wirkung auf die T-Zell-Effektorfunktionen vorstellbar. Deshalb wurde die Sekretion von typischen Th1- und Th2-Zytokinen nach Inkubation mit TRAIL untersucht. Für die Bestimmung von INF- γ wurden T-Zellen von sechs Th1/Th0 antigenspezifischen T-Zelllinien und für die Bestimmung von IL-4 T-Zellen von fünf Th2/Th0 T-Zelllinien mit α CD3+ α C28 für 48h in FSC Medium und in An- und Abwesenheit von 300ng/ml TRAIL kultiviert. Anschließend wurden die für den jeweiligen T-Zell-Phänotyp typischen Zytokine, INF- γ für Th1-Zellen und IL-4 für Th2-Zellen (Janeway et al., 1999), in den Zellkulturüberständen mit ELISAs bestimmt. Zum Vergleich wurde

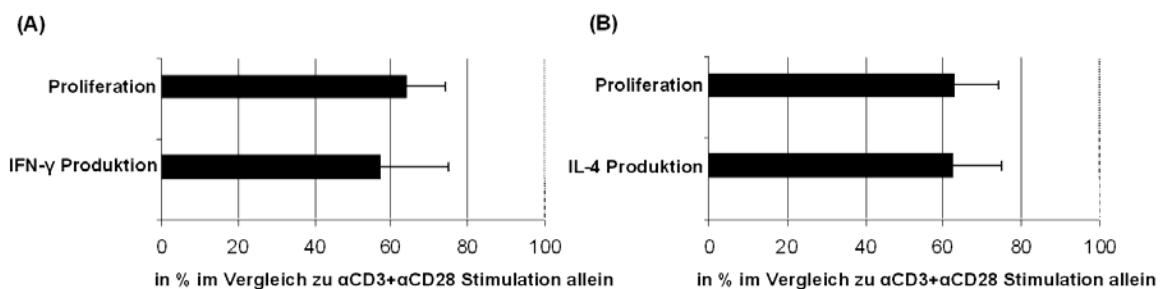


Abbildung 16: Verringerung der Zytokinproduktion durch TRAIL.

A) IFN- γ Produktion in sechs Th1/Th0 T-Zelllinien

B) IL-4 Produktion in 5 Th2/Th0 T-Zelllinien.

Die Ergebnisse sind in Prozent \pm SEM im Vergleich zu Stimulation mit α CD3+ α CD28 allein angegeben. Die mittleren Zytokinkonzentrationen und cpm Werte waren 626,7pg/ml und 12734 cpm (α CD3+ α CD28 Stimulation allein) und 357,2 pg/ml und 8149 cpm (300ng/ml TRAIL) für IFN- γ ; und 69,48 pg/ml und 15672 cpm (α CD3+ α CD28 Stimulation allein) und 43,2 pg/ml und 9794 cpm (300ng/ml TRAIL) für IL-4.

parallel die Zellproliferation mittels Inkorporation von [3 H]Thymidin nach 72h gemessen.

Abbildung 16 zeigt, dass TRAIL die IFN- γ Produktion in stimulierten Th1/Th0 T-Zelllinien (Wilcoxon Test: $p < 0,01$) und IL-4 Produktion in stimulierten Th2/Th0 T-Zelllinien (Wilcoxon Test: $p < 0,05$) signifikant verringerte.

3.3. Die Expression und Regulation von löslichem CD95

3.3.1. Die Etablierung der Messmethode

CD95-Oberflächen-Antigen wurde auf diversen menschlichen Zelllinien nachgewiesen (Leithauser et al., 1993). Mit Hilfe von Western blotting kann CD95 in Proteinform auch im Zelllysat nachgewiesen werden. Schwieriger ist es, die nicht membranständige, also lösliche Form von CD95 (sCD95) zu bestimmen. Mit einem käuflich erhältlichen ELISA-Kit ist es möglich, sCD95 im menschlichen Serum zu bestimmen. Trotzdem misslang es bisher, sCD95 in Zellkulturüberständen zu messen. Dies kann entweder daran liegen, dass die entsprechenden Zellen nicht in der Lage sind, sCD95 zu produzieren, oder daran, dass die Konzentrationen an freiem sCD95 in den Zellkulturüberständen unter der Nachweisgrenze des ELISA liegen (30pg/ml). Da mehrere Studien gezeigt hatten, dass bei der Aktivierung von Leukozyten durch „alternative splicing“ mRNA-Formen entstehen, deren Translation zur Entstehung von sCD95 führen würde (Cascino et al., 1995; Liu et al., 1995), lag es nahe, eine zu geringe Konzentration des Moleküls in den Überständen zu vermuten. Deshalb wurden zwei verschiedene Methoden, die Überstände zu konzentrieren, getestet: die Azetonfällung und die Vakuumkonzentration. Dazu wurden PBMC von fünf verschiedenen Probanden mit PHA+IL-2 stimuliert oder als Kontrolle unstimuliert belassen. Nach 72h wurden die Überstände abgenommen und zweimal zentrifugiert. Eine relativ lange Inkubationszeit von 72h wurde gewählt, um späte Effekte einer Leukozytenaktivierung mit zu erfassen. Ein Teil der Überstände wurde anschließend mittels Azetonfällung bzw. Vakuumkonzentration (siehe Material und Methoden) im Verhältnis 10:1 aufkonzentriert. Anschließend wurden sCD95 in den originalen und aufkonzentrierten Überständen mit einem sandwich-ELISA gemessen. Abbildung 17 zeigt, dass sowohl mit der Azetonfällungs- als auch mit der Vakuumkonzentrationsmethode sCD95 in den Zellkulturüberständen nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz dazu konnte in den unbehandelten Überständen kein sCD95 detektiert werden. Um die Azetonfällungs- und Vakuumkonzentrationsmethode zu vergleichen, wurden dieselben Zellkulturüberstände der fünf Spender eingesetzt. Es konnte kein Unterschied in der Güte der

Konzentrationsprozesse festgestellt werden (Abb. 17B, Wilcoxon Test: $p > 0,05$). Weil die Azetonfällungsmethode einfacher ist, wurde diese fortan als Standardmethode eingesetzt.

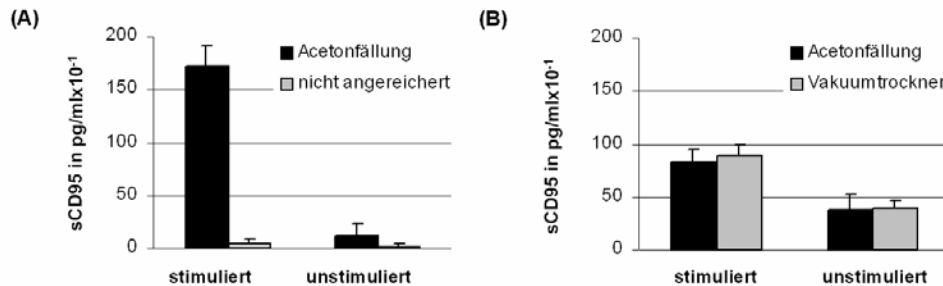


Abbildung 17: Lösliches CD95 im ELISA – Etablierung des Konzentrationsverfahrens

- A) Lösliches CD95 (sCD95) in originalen Zellkulturüberständen (graue Säulen) und nach Acetonfällung (schwarze Säulen) von stimulierten und unstimulierten PBMC. Die Nachweisgrenze des ELISA liegt bei 30pg/ml. Die hier aufgetragenen Zellkulturüberstände wurden 10:1 konzentriert, weshalb der angegebene Wert mit 10^{-1} multipliziert werden muss, um die tatsächliche sCD95 Konzentration in den Zellkulturüberständen zu erhalten. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt.
- B) sCD95 derselben Zellkulturüberstände nach Aufkonzentration durch Azetonfällung (schwarze Säulen) oder durch eine Vakuumtrocknung (graue Säulen). Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

sCD95 wurde in humanem Serum nachgewiesen (Zipp et al., 1998c; Zipp et al., 1998d). Deshalb wurde geprüft, ob der Einsatz bestimmter Zellkulturmedien die Messung von sCD95 beeinflusst. Dazu wurde humanes AB-Medium und FCS-Medium mit der Azetonfällungsmethode aufkonzentriert, in drei unterschiedlichen ELISA-Ansätzen als Doppelwert aufgetragen und gemäß dem Standardprotokoll gemessen. Wie in Abbildung 18 gezeigt, enthält AB-Medium geringe Mengen sCD95. Für alle weiteren Experimente wurde deshalb FCS-Medium als Zellkulturmedium eingesetzt.

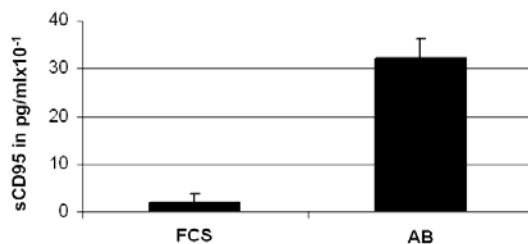


Abbildung 18: sCD95 im ELISA – Hintergrund durch Zellkulturmedien. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Da die Proben im Verhältnis von 1: 10 aufkonzentriert wurden, erfolgt die Konzentrationsangabe in pg/ml $\times 10^{-1}$.

3.3.2. Bestimmung von sCD95 im Überstand von PBMC

Bereits die oben beschriebenen Vorexperimente zeigten, dass stimulierte PBMC sCD95 sezernieren können. Mit den folgenden Experimenten sollte nun systematisch geprüft werden, welche Stimuli PBMC zur Sekretion von sCD95 anregen. Frisch isolierte PBMC von sechs gesunden Probanden wurden in einer Konzentration von $1 \times 10^6/\text{ml}$ in FCS-Medium suspendiert und je nach Ansatz unstimuliert belassen (Kontrollen) oder mit den folgenden Agenzien stimuliert: $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ PHA + $20 \text{ U}/\text{ml}$ rekombinantes humanes IL-2, $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ PHA oder $\alpha\text{CD}3 + \alpha\text{CD}28 + 20 \text{ U}/\text{ml}$ IL-2 als T-Zell-Stimulation, $20 \text{ pg}/\text{ml}$ MBP oder $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ TT oder $5 \mu\text{g}$ BP als Antigenstimulation (siehe Material und Methoden für genaue Bedingungen); $0,01\%$ SAC als B-Zell-Aktivierung; $50 \text{ ng}/\text{ml}$ LPS als Monozyten-Stimulus oder $100\text{-}1000 \text{ IU}$ IFN- β -1a als zellunspezifischer Stimulus. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank (37°C , 5% CO_2 -Gehalt) in getrennten Ansätzen für die Proteinbestimmung, für die Bestimmung der Zellzahlen sowie der Stimulationsindizes. Nach 72h wurden die Zellkulturplatten zentrifugiert, die Überstände abgetrennt und aufkonzentriert und dann im CD95-ELISA-Kit gemessen. Die Anzahl lebender Zellen wurde nach der Trypanblaumethode mit Hilfe von Neubauer-Hämatozytometern bestimmt. Zusätzlich wurde die Proliferation durch Zugabe von $0,5 \mu\text{Ci}/\text{Ansatz}$ [^3H]Thymidin nach 80h und weiteren 16h Inkubationszeit im Szintillationszähler gemessen. Alle Proliferationsmessungen wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt.

Abbildung 19 zeigt, dass nach 72h sCD95 ausschließlich in den mit T-Zell-Stimuli aktivierten PBMC nachgewiesen werden konnte. Stimulation mit Antigen allein führte zu keiner sCD95-Sekretion und die Stimulation mit PHA ohne die Zugabe von IL-2 zu einer sehr geringen, nicht sicher nachweisbaren sCD95-Sekretion. Der effizienteste Stimulus war eine Vorbereitung der Zellkulturplatten mit $\alpha\text{CD}3 + \alpha\text{CD}28$ in Verbindung mit IL-2.

Alle T-Zell-Stimuli, außer den Antigenen, und SAC führten zu einer markanten Zellproliferation, gemessen nach 96h. Nach 72h lagen die absoluten Zellzahlen jedoch noch im Bereich der eingesetzten Zellmengen ($1 \times 10^6/\text{ml}$) oder darunter.

Die Zeit, die zwischen Transkription, Translation und Sekretion von Proteinen vergehen kann, ist variabel. Um weder einen sehr späten noch einen sehr frühen Sekretionszeitpunkt zu verpassen, wurde eine Verlaufsuntersuchung der sCD95-

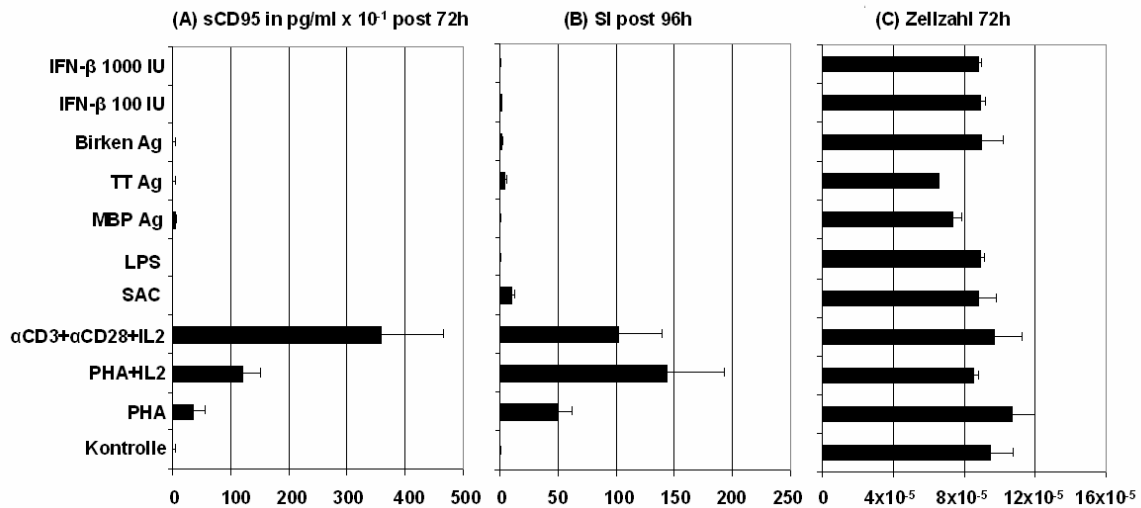


Abbildung 19: sCD95 im Überstand von PBMC nach 72h unter verschiedenen Stimuli

- A) sCD95 in Zellkulturüberständen. Die Nachweisgrenze des ELISA liegt bei 30 pg/ml. Dargestellt sind die Mittelwerte±SEM.
 B) Proliferation als Stimulationsindex (SI).
 C) Anzahl lebender Zellen in Kultur nach 72h. Dargestellt sind die Mittelwerte±SEM.

Sekretion durchgeführt. Frisch isolierte PBMC von fünf gesunden Probanden wurden mit PHA, SAC bzw. ohne Stimulus (Kontrolle) kultiviert. Medium (zum Zeitpunkt 0h) oder Überstände wurden zu den verschiedenen Zeitpunkten (nach 5h, 1-7d) abgenommen, aufkonzentriert und im CD95-ELISA gemessen. Parallel wurde die Proliferation mittels [³H]Thymidin und die Anzahl lebender Zellen mit Trypanblau bestimmt.

Abbildung 20 zeigt, dass mit PHA (ohne IL-2) stimulierte PBMC erst nach vier Tagen eine deutliche sCD95-Sekretion zeigten, die im Verlauf weiter anstieg. Der Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin und demnach die DNA-Replikation in PHA-stimulierten PBMC erreichte seine höchsten Werte schon nach 72+12h, fiel dann wieder ab, blieb aber bis zum siebten Tag erhöht. Die Anzahl lebender Zellen in Kultur stieg nach dem vierten Tag an und verdoppelte sich bis zum sechsten Tag.

Nach vier Tagen in Kultur war auch in den mit SAC stimulierten PBMC-Proben sCD95 in geringer Konzentration nachweisbar. Diese stieg weiter an, blieb aber weit unter den mit PHA erzielten Werten. Die Proliferation von PBMC nach Stimulation mit SAC war wesentlich geringer ausgeprägt, und die Zellzahlen stiegen nicht an, sondern blieben relativ konstant bei etwa 1x10⁶/ml.

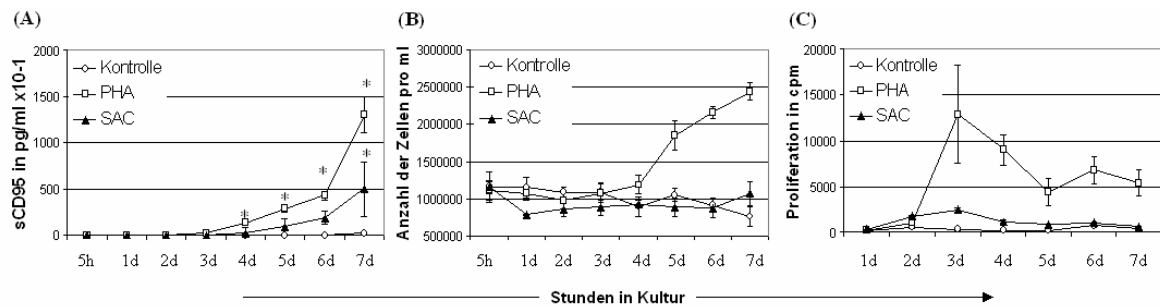


Abbildung 20: sCD95 im Überstand von PBMC im Verlauf

- A) sCD95 in pg/ml. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 5 gesunden Probanden. Die Signifikanz wurde mit dem Wilcoxon Test (* $P < 0,05$) geprüft.
- B) Anzahl lebender Zellen, bestimmt mit der Trypanblaumethode (Mittelwerte \pm SEM).
- C) Proliferation in counts per minute (Mittelwert \pm SEM).

In einem weiteren Experiment wurde erneut die Wirkung von IFN- β auf die sCD95-Sekretion evaluiert. Dazu wurden PBMC von vier gesunden Probanden jeweils ohne Stimulus, in Anwesenheit von 100 oder 1000 IU IFN- β , in Anwesenheit von PHA+IL-2 und von 100 oder 1000 IU IFN- β oder in Anwesenheit von PHA+IL-2 allein kultiviert. Um sehr späte Effekte mit zu erfassen, wurden die Überstände erst nach 96h abgenommen. In den Ansätzen ohne Stimulus oder mit IFN- β ohne PHA+IL-2 konnte kein sCD95 gemessen werden. Im Gegensatz dazu wurde erwartungsgemäß in den mit PHA+IL-2 stimulierten Zellkulturen eine sCD95-Sekretion nachgewiesen. In den mit und PHA+IL-2 und IFN- β stimulierten Ansätzen wurden im Vergleich dazu geringere sCD95-Konzentrationen gefunden (Abb. 21). Dies steht in Übereinstimmung mit der außerordentlich starken Aktivierung der PBMC durch PHA+IL-2, was sich in hohen

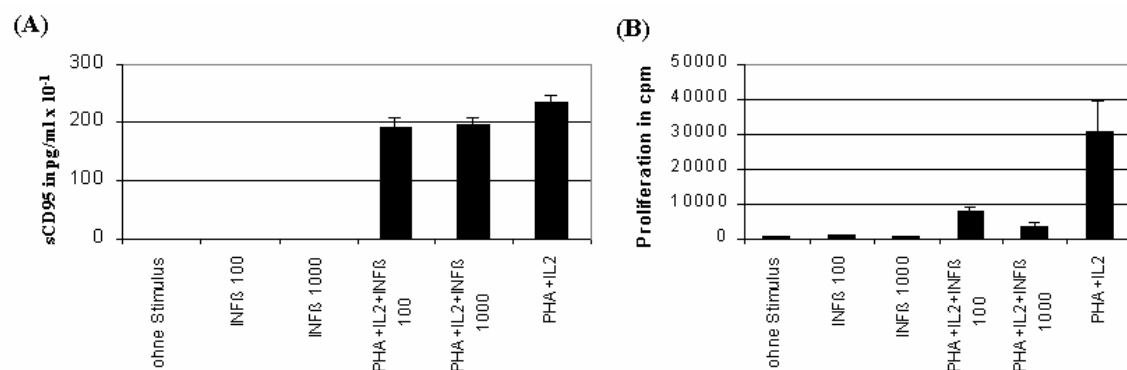


Abbildung 21: sCD95 im Überstand von PBMC nach Stimulation mit PHA+IL-2 und IFN- β nach 96h.

- A) sCD95 in pg/ml. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 4 gesunden Probanden.
- B) Proliferation in counts per minute ([³H]Thymidin, Mittelwert \pm SEM).

Werten im Proliferationstest niederschlägt, während die Proliferation in den zusätzlich mit IFN- β behandelten Proben signifikant vermindert ist (ANOVA und Tukey-Kramer Multiple Comparisons Tests: $P < 0,05$). Diese Inhibition der Proliferation durch IFN- β war dosisabhängig.

3.3.3. Bestimmung von sCD95 im Überstand von aktivierten T-Zellen, B-Zellen und Monozyten

Die durchgeführten Experimente mit PBMC gaben Hinweise darauf, dass T- und B-Zellen sCD95 sezernieren. Deshalb sollten nun getrennte Zellpopulationen untersucht werden. Mit der MACS-Technik wurden T-Zellen ($CD3^+$), B-Zellen ($CD19^+$) und Monozyten ($CD14^+$) in PBMC-Proben mit Antikörpern gegen CD-Gruppenantigene markiert und magnetisch separiert. Die Reinheit der Subpopulationen lag über 96%. Anschließend wurden T-Zellen mit PHA+IL-2, B-Zellen mit SAC und Monozyten mit LPS stimuliert. Für die T-Zell-Kulturen standen Zellen von sechs verschiedenen gesunden Probanden zur Verfügung, für die B-Zell- und Monozyten-Kulturen von drei gesunden Probanden. Nach 120h wurden Überstände abgenommen, aufkonzentriert und mit dem CD95-sandwich-ELISA analysiert. Dieser lange Zeitraum wurde gewählt, da eine Stimulation von PBMC mit SAC in den Vorexperimenten ergeben hatte, dass sCD95 erst nach fünf Tagen messbar ist. Abbildung 22 zeigt, dass nur gereinigte T-Zellen unter PHA+IL-2 Stimulation sCD95 sezernierten. Weder unstimulierte noch mit SAC stimulierte B-Zellen sezernierten sCD95, ebenso wenig wie Monozyten ohne und mit LPS-Stimulation. In parallelen Ansätzen wurde die Proliferation mit [3H]Thymidin bestimmt. Der mittlere SI für T-Zellen war 326 ± 145 und für B-Zellen 49 ± 37 . Damit konnte die Funktionalität der eingesetzten Zellen und Stimuli nachgewiesen werden.

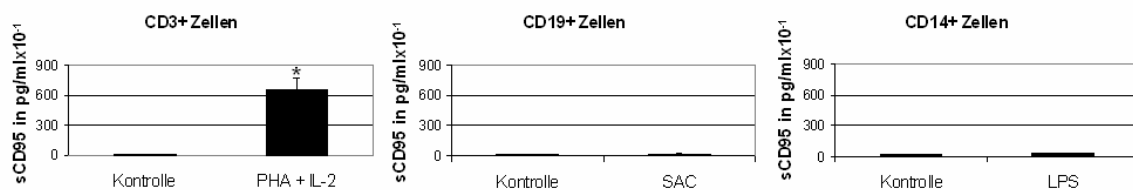


Abbildung 22: sCD95 im Überstand von isolierten T- , B-Zellen und Monozyten. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM in pg/ml von 6 bzw. 3 gesunden Probanden nach einer Inkubationszeit von 120h. Die Signifikanz wurde mit dem Wilcoxon Test (* $p < 0,05$) geprüft.

3.3.4. Bestimmung von sCD95 im Überstand von T-Zelllinien

Die Fähigkeit von T-Zellen, nach PHA-Stimulation sCD95 abzugeben, sollte mit humanen antigenspezifischen T-Zelllinien bestätigt werden. Antigenspezifische T-Zelllinien wurden mittels eines modifizierten „split-well-Verfahrens“ etabliert. Anschließend wurden die T-Zellen von MBP-spezifischen T-Zelllinien von drei gesunden Probanden in Anwesenheit von adäquaten (PHA+IL-2, α CD3+ α C28 + IL-2), inadäquaten (SAC, LPS) oder ohne Stimuli (Kontrolle) kultiviert. Die inadäquaten Stimuli wurden eingesetzt, um deren unspezifischen Einfluss auf T-Zellen zu testen und somit auszuschließen, dass die in PBMC beobachtete Induktion von sCD95 durch SAC eine direkte Wirkung des Stimulus auf T-Zellen als Ursache hat. Nach 72h wurden die Überstände abgenommen, aufkonzentriert und mit dem CD95-ELISA analysiert. Parallel dazu wurden Proliferationstests durchgeführt. Abbildung 23 zeigt, dass die Ergebnisse aus den vorhergehenden Experimenten hier bestätigt werden konnten. Stimulation mit T-Zell-spezifischen Stimuli (PHA+IL-2 und α CD3+ α C28 + IL-2) führte zur Sekretion von sCD95 und zur Proliferation von antigenspezifischen T-Zellen. Die inadäquaten Stimuli führten im Vergleich zum Leerwert (Kontrolle) zu keiner Erhöhung von sCD95-Sekretion oder Zellproliferation. Eine Kinetik gab Anhalt dafür, dass auch im Falle von T-Zelllinien höhere Konzentrationen von sCD95 erst nach 72h nachweisbar sind (Abb. 23C).

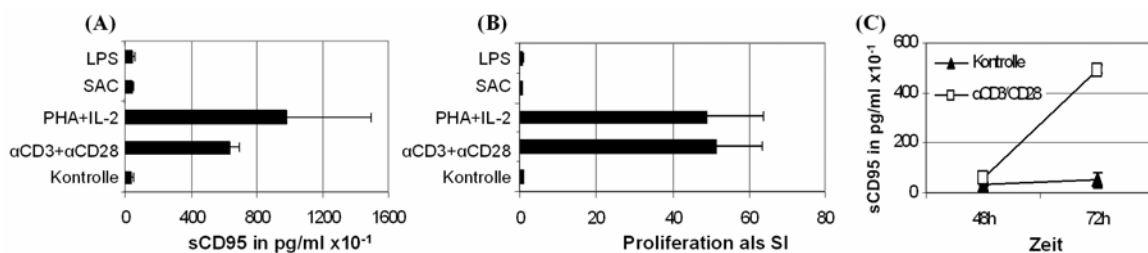


Abbildung 23: sCD95 in pg/ml im Überstand von drei antigenspezifischen T-Zelllinien. Die antigenspezifischen T-Zelllinien wurden mittels eines „split-well-Verfahrens“ etabliert und mit oder ohne (Kontrollen) Stimulus kultiviert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (A). Parallel dazu wurden Proliferationstests mit [3 H]Thymidin durchgeführt (B). Im Falle einer TT- spezifischen Linie fanden sCD95-Bestimmungen zu einem weiteren Zeitpunkt statt (C).

In einem weiteren Experiment sollte gezeigt werden, ob auch eine Stimulation mit Antigen zur Sekretion von sCD95 führen kann. Dazu wurden jeweils $0,25 \times 10^6$ T-Zellen von vier MBP-spezifischen T-Zelllinien (TCL) mit $0,75 \times 10^6$ bestrahlten Antigen-präsentierenden Zellen (APC) und 20pg/ml MBP-Antigen (Ag) und 20U/ml IL-2

inkubiert. Als Kontrolle dienten zum einen T-Zellen, die nur mit APC und IL-2 versetzt waren, und zum anderen T-Zellen, die nur mit Antigen inkubiert wurden. Nach 48h wurden die Überstände abgenommen, aufkonzentriert und mit dem CD95-ELISA analysiert. Abbildung 24 zeigt, dass auch mit APC und Antigen stimulierte T-Zellen sCD95 produzierten. Bestrahlte autologe APC und Antigen alleine dagegen gaben kein sCD95 ab (ELISA-Nachweisgrenze bei 30pg/ml). Ebenso konnte eine mögliche Interaktion der antigenspezifischen T-Zellen mit APC ohne Antigen und eine daraus resultierende sCD95-Expression ausgeschlossen werden (Kontrolle TCL+APC).

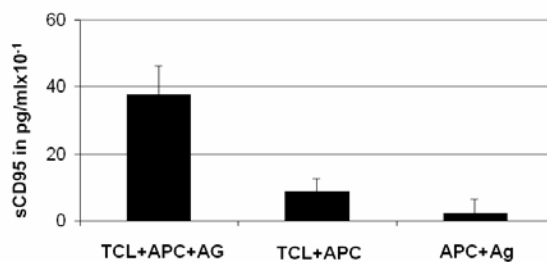


Abbildung 24: sCD95 in pg/ml im Überstand von vier antigenspezifischen T-Zelllinien (TCL) stimuliert mit Antigen-präsentierenden Zellen (APC) und Antigen (Ag) und Kontrollen (Mittelwerte±SEM).

3.4. Mögliche immunomodulatorische Wirkung von sCD95

3.4.1. Expression von sCD95 im Vergleich zwischen MS-Patienten und gesunden Probanden

Mehrere Studien, u.a. über sCD95-Serumkonzentrationen von MS-Kranken, stellen einen Zusammenhang zwischen dem CD95-Apoptosesystem und einer möglichen Immundysregulation bei der MS her (Zipp et al., 1999a). Deshalb sollte die sCD95-Sekretion von PBMC bei MS-Kranken und Gesunden unter konstanten Bedingungen verglichen werden. PBMC von 12 gesunden Probanden und 12 Patienten mit gesicherter, aber bisher unbehandelter RRMS wurden in An- und Abwesenheit von PHA+IL-2 kultiviert. Nach 72h wurden die Überstände abgenommen, aufkonzentriert und im CD95-ELISA gemessen. Gleichzeitig wurde die Anzahl lebender Zellen nach 72h mit der Trypanblaufärbung bestimmt. Erwartungsgemäß reagierten sowohl die PBMC von MS-Kranken als auch die von Gesunden mit einer sCD95-Absonderung nach der Stimulation. Die in Abbildung 25 etwas geringeren sCD95-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen der MS-Kranken sind jedoch statistisch nicht signifikant niedriger als die der gesunden Probanden (Mann-Whitney Rangsummen-Teste: $p > 0,1$).

Auch wenn man die sCD95-Konzentrationen jedes Ansatzes auf die Zellzahl desselben Ansatzes bezieht, sind keine signifikanten Unterschiede zwischen MS-Kranken und Gesunden feststellbar (Abbildung 25B).

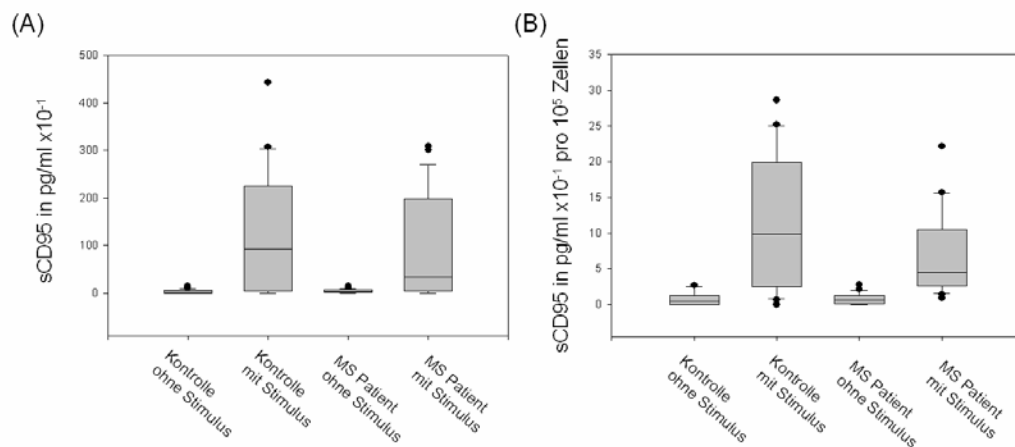


Abbildung 25: Expression von sCD95 durch PBMC im Vergleich zwischen MS-Patienten und Gesunden nach 72h.

A) sCD95 in pg/ml. Dargestellt sind die Mediane und die F-Spannen als Boxplot.

B) sCD95-Produktion bezogen auf die Zellzahl nach 72h.

3.4.2. Longitudinale Studie von sCD95-Serumkonzentrationen bei schwangeren MS-Patientinnen

Serumproben von 69 Patientinnen mit klinisch definierter MS wurden bei geplanter Schwangerschaft vor, während der Schwangerschaft und bis zu sechs Monate postpartal bei Routineuntersuchungen gewonnen. Folgende mittlere sCD95-Serumkonzentrationen wurden gemessen: vor der Schwangerschaft $561,0 \pm 197,5$ pg/ml (Mittelwert \pm Standard Error of the Mean); im ersten Trimenon $583,1 \pm 71,5$; im zweiten Trimenon $555,4 \pm 52,1$; im dritten Trimenon $689,3 \pm 49,3$; in den ersten drei Monaten nach der Geburt $585,2 \pm 53,3$; und nach mehr als 3 Monaten nach der Geburt $621,8 \pm 94,5$.

Die erhobenen longitudinalen Daten über sCD95-Serumkonzentrationen bei Schwangeren bzw. post- oder präpartalen Frauen sind unstrukturiert, d.h. bei jedem Individuum zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Schwangerschaft abgenommen, und unbalanciert, d. h. nicht jedes Individuum hat die gleiche Anzahl von Messpunkten (ungefähr 4 ± 1 pro Patient). In der präpartalen und spät-postpartalen Phase existieren nur wenige Messwerte. Für derartige nicht-unabhängige Daten sind repeated measurement ANOVA-Methoden nicht geeignet, da das Zuordnen von Zeitpunkten zu Zeiträumen zum Verlust von statistischer Power und Exaktheit führt. Deshalb wurde stattdessen die

Growth Curve Modelling-Methode nach den Richtlinien von Singer and Willett (Singer und Willett, 2003) angewandt. Dazu diente die SPSS 11.0 “Mixed Model Procedure” mit einer “first order autoregressive repeated covariance matrix”, “full maximum likelihood estimation”, und “type III sum of squares”. Die „first order autoregressive covariance matrix“ ist üblich bei der Analyse longitudinaler Daten und erlaubt die Autokorrelation von Fehlern. Als einheitliche exakte Zeitvariable dienten Wochen zentriert am tatsächlichen Geburtstermin (also z.B. bei Geburt in der 39. Schwangerschaftswoche (SSW) entspräche ein Entnahmezeitpunkt in der fünften SSW einer Zeitvariablen WOCHE = -34).

Zunächst wurden Verläufe der sCD95-Konzentrationen von einer repräsentativen Gruppe einzelner Individuen beurteilt. Diese Verläufe (eine Auswahl davon ist in Abb. 26 abgebildet) waren äußerst heterogen.

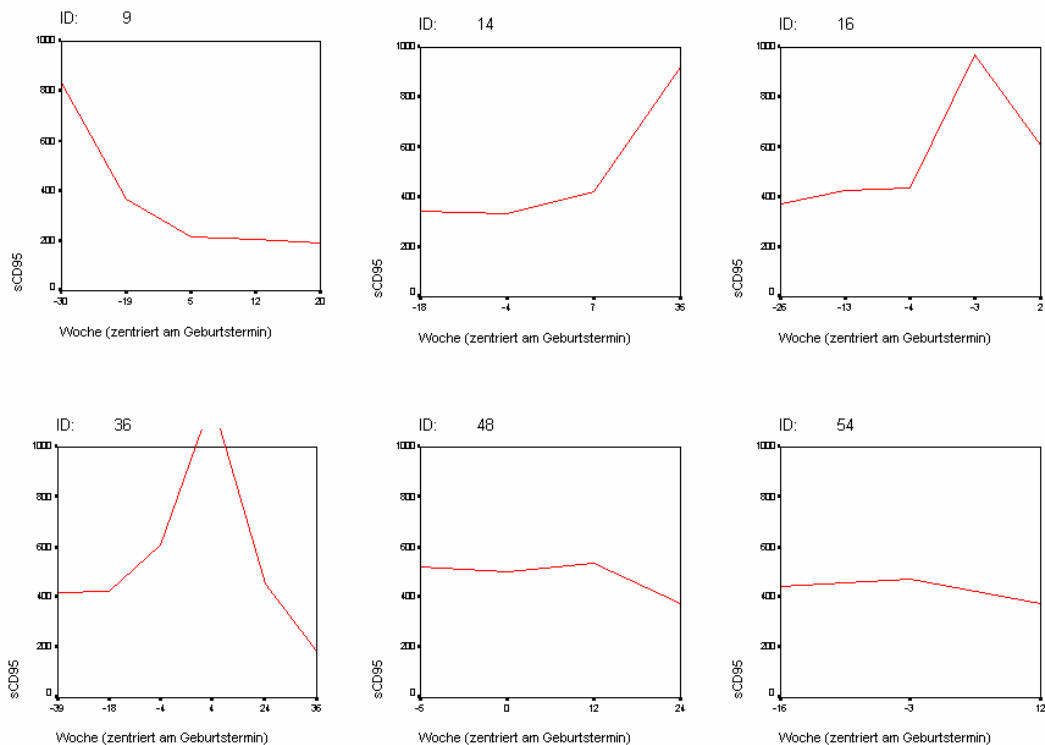


Abbildung 26: sCD95-Konzentrationen in $\text{pg/ml} \times 10^1$ im Verlauf bei einer Auswahl von MS-Patientinnen vor, während und nach der Schwangerschaft.

Eine Projektion der Verläufe der Serumkonzentrationen aller Individuen in ein Liniendiagramm lässt ebenso keinen eindeutigen Trend erkennen (Abb. 27). Um den Verlauf der gemessenen sCD95-Serumkonzentrationen zu modellieren, wurden

verschiedene Growth Curve Modelle gegeneinander getestet. Die verschiedenen hypothetischen Modelle wurden anhand theoretischer Überlegungen aufgestellt. Kernpunkt war hierbei die vielfach nachgewiesene Tatsache, dass die Krankheitsaktivität der MS während der Schwangerschaft nachlässt, und dass sCD95

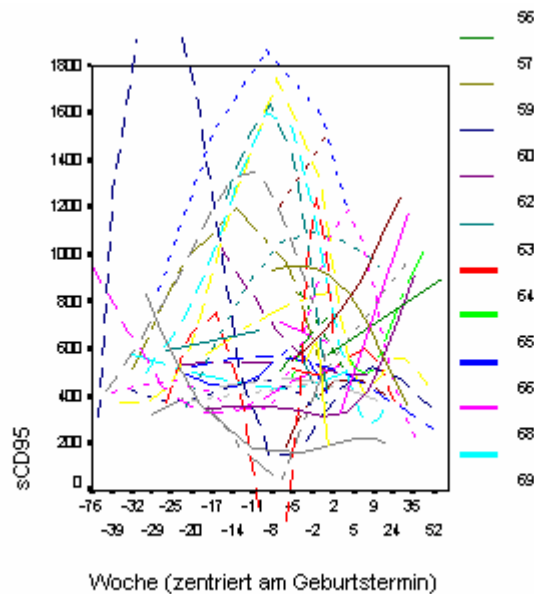


Abbildung 27: Übereinanderprojektion aller sCD95-Konzentrationen in $\text{pg/ml} \times 10^{-1}$ im Verlauf bei MS-Patientinnen vor, während und nach der Schwangerschaft.

als Apoptose-inhibierendes Protein dabei eine Rolle spielen könnte. Als Kontrollmodell (M0) diene ein lineares “unconditional growth model” des Formates:

$$Y_{ij} = \pi_{0i} + \pi_{1i} \text{WOCH}E_{ij} + \varepsilon_{ij} \quad (\text{“within person” or “level 1” Modell})$$

$$\pi_{0i} = Y_{00} + \zeta_{0i} \quad (\text{“between person” or “level 2” Modell})$$

$$\pi_{1i} = Y_{10} + \zeta_{1i} \quad (\text{“between person” or “level 2” Modell})$$

Y_{ij} : sCD95-Serumkonzentration der Person i zum Zeitpunkt j

π_{0i} : sCD95-Serumkonzentration der Person i zum Zeitpunkt null

π_{1i} : Änderung der sCD95-Serumkonzentration der Person i pro Zeitraum

ε_{ij} : zufälliger Messfehler der Daten zu Person i zum Zeitpunkt j

Y : “level 2“ Intercepts

ζ : “level 2“ Residuen (Varianz/Kovarianz- Parameter)

Modell M1 dagegen war quadratisch:

$$Y_{ij} = \pi_{0i} + \pi_{1i} \text{WOCHE}_{ij} + \pi_{2i} \text{WOCHE}_{ij}^2 + \varepsilon_{ij}$$

$$\pi_{0i} = Y_{00} + \zeta_{0i}$$

$$\pi_{1i} = Y_{10} + \zeta_{1i}$$

$$\pi_{2i} = Y_{20} + \zeta_{2i}$$

wogegen Model M2 eine diskontinuierlicher Steigung der Geraden durch einen zusätzlichen „level 1“ Term für SSW (der vor und nach der Schwangerschaft =0 ist) erlaubt.

$$Y_{ij} = \pi_{0i} + \pi_{1i} \text{WOCHE}_{ij} + \pi_{2i} \text{SSW}_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

$$\pi_{0i} = Y_{00} + \zeta_{0i}$$

$$\pi_{1i} = Y_{10} + \zeta_{1i}$$

$$\pi_{2i} = Y_{20} + \zeta_{2i}$$

Die Ergebnisse der Modellierung (dargestellt in Tabelle 4) zeigten keine signifikanten Unterschiede in den „goodness of fit“-Statistiken zwischen Modell M1 und M0 bzw. M2 und M0. Auch erreichte keiner der eingesetzten Prädiktoren ein akzeptables Signifikanzniveau.

<i>Parameter (Fixed Effects)</i>	<i>M0</i>	<i>M1</i>	<i>M2</i>
Intercept	612,40 (25,07***)	608,55 (27,45***)	488,72 (97,99***)
Woche	0,61 (1,14ns)	0,54 (1,16ns)	0,99 (1,15ns)
Woche*Woche		0,01 (0,02ns)	
SSW			2,51 (1,54ns)
<i>Gesamtmodell</i>			
- 2 Log Likelihood	2171,11	2170,99	2168,49
Akaike's Information Criterion (AIC)	2177,11	2178,99	2176,49
Schwarz's Bayesian Criterion (BIC)	2186,18	2191,09	2188,59
Differenz zu Kontroll Modell, D df=1			
- 2 Log Likelihood		0,12ns	2,62ns

Tabelle 4: Getestete „Growth Curve“- Modelle mit sCD95-Serumkonzentrationen als abhängige Variable (Standard Error in Klammern, ns = nicht signifikant)

Da keine geeigneten zusätzlichen Daten wie z.B. der EDSS Score bei Schwangerschaftsbeginn oder über Therapiemethoden vorlagen, war es nicht möglich „level 2“ oder „between person“ Prädiktoren zu erproben. Diese könnten gegebenenfalls die inter-individuelle Variation der Kurvenverläufe erklären.

4. Diskussion

Trotz intensiver Forschung in den letzten Jahrzehnten ist die Ätiopathogenese der chronisch-entzündlichen ZNS-Erkrankung Multiple Sklerose noch immer nicht genau bekannt. In der Mehrheit der Studien finden sich Hinweise darauf, dass Autoimmunphänomene in einem engen Zusammenhang mit der Auslösung und der Aufrechterhaltung des Krankheitsgeschehens stehen. Demnach kommt es wahrscheinlich infolge eines Versagens inhibierender Regulationsmechanismen zur Persistenz von aktivierten myelinspezifischen $CD4^+$ -T-Zellen. Diese durchwandern die Blut-Hirnschranke und werden durch die Präsentation von Myelin-Antigenen auf APC reaktiviert. Nach der Reaktivierung setzen sie entzündungsinduzierende und gewebsdestruierende Mediatoren im Hirnparenchym frei, die zur Zerstörung von glialen und axonalen Strukturen führen (Trapp et al., 1998).

Zwar haben sich die Therapiemöglichkeiten für die MS durch die Einführung von IFN- β wesentlich verbessert, doch wird die Lebensqualität der meisten Patienten langfristig durch fortschreitende körperliche Behinderungen beeinträchtigt. Deshalb sind diagnostische Parameter, die Rückschlüsse auf den individuellen Verlauf der Erkrankung gestatten, sowie effektivere Therapeutika dringend erforderlich. Grundvoraussetzung dafür ist ein empirisch belegbares Konzept der Pathogenese der MS.

Apoptosemechanismen tragen bei der MS wahrscheinlich direkt zum Untergang der Oligodendrozyten im ZNS bei und haben somit eine Bedeutung als Effektormechanismus. Darüber hinaus spielt ein Mangel an Apoptose für das Überleben aktivierter autoreaktiver Immunzellen im peripheren Blut eine Rolle (Krammer, 1999; Zang et al., 1999; Zipp et al., 1999a; Zipp, 2000). Da autoreaktive T-Zellen sowohl bei MS-Kranken, als auch bei Gesunden vorkommen, kann man annehmen, dass T-Zellen bei MS-Kranken durch eine höhere Resistenz gegenüber apoptotischen Stimuli gekennzeichnet sind, oder dass die Apoptosesysteme in ihrer Funktion beeinträchtigt sind (Ciusani et al., 1998; Macchi et al., 1999; Zipp et al., 1998d). So konnte gezeigt werden, dass die Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl- X_L in PBMC von MS-Patienten gesteigert ist und mit einer erhöhten Resistenz dieser Zellen gegen AICD einhergeht (Waiczies et al., 2002). Unterstützt wird die Annahme einer erhöhten Apoptose-Resistenz durch die signifikant höhere Frequenz an ZNS-spezifischen $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen bei MS-Patienten (Crawford et al., 2004; Zhang und Raus, 1994).

Als weitere Belege gelten lymphoproliferative und autoimmune Syndrome in CD95-Gen (lpr) bzw. CD95L-Gen-defizienten (gld) Mausmutanten (Nagata und Suda, 1995) sowie die Exazerbation eines MS-ähnlichen Krankheitsbildes im Tiermodell (EAE) durch eine systemische TRAIL-Blockade (Hilliard et al., 2001). Außerdem deuten erhöhte Protein- bzw. mRNA-Konzentrationen von sCD95 und sTRAIL bei MS-Patienten auf eine Schlüsselrolle dieser Apoptosesysteme auch beim Menschen hin (Huang et al., 2000; Zipp et al., 1998d).

Vorraussetzung für das Verständnis der oben genannten Phänomene sind nicht zuletzt konkrete Daten über die Expression und Regulation von sCD95 und TRAIL. Auf die Fragen nach diesen Expressions- und Regulationsmechanismen, versucht die vorliegende Arbeit Antworten zu geben.

4.1. Expression, Regulation und mögliche Bedeutung von TRAIL

Lösliches TRAIL (sTRAIL) wurde mit einem hochspezifischen sandwich-ELISA bestimmt, und membranständiges TRAIL auf Zelloberflächen mit einem Vierfarben-Durchflusszytometer analysiert. Durch den Einsatz zellspezifischer Stimuli (spezifisch für T-, B-Zellen oder Makrophagen) konnte gezeigt werden, dass T-Zellen in der Lage sind, große Mengen sTRAIL zu sezernieren, wenn sie mit PHA+IL-2 stimuliert werden. Die membranständige TRAIL-Expression war hingegen unverändert verglichen mit den nicht stimulierten Kontrollzellen. Im Gegensatz dazu konnte durch eine Stimulation von aufgereinigten B-Zellen mit α CD40+IL-4 weder eine sTRAIL-Sekretion noch eine TRAIL-Oberflächenexpression induziert werden. Für die LPS-Stimulation von Monozyten konnte ein moderater Kurzzeiteffekt auf die Sekretion von sTRAIL, nicht aber auf die Oberflächenexpression von TRAIL, festgestellt werden. Andererseits ergaben die Experimente, dass IFN- β nur bei Monozyten zu einer signifikanten dosisabhängigen Steigerung der sTRAIL-Sekretion führt, obwohl IFN- β alle Leukozytensubgruppen beeinflussen kann, da sowohl T-, B-Zellen, als auch Monozyten IFNAR 1 und 2 Rezeptoren exprimieren (Oritani et al., 2001). IFN- β stellte zudem das einzige hier eingesetzte Agens dar, welches eine klare Erhöhung der TRAIL-Oberflächenexpression auf Monozyten und in geringerem Ausmaß auf B-Zellen bewirkte.

Verschiedene Autoren vermuten, dass T-Zellen in der Lage sind, sTRAIL zu sezernieren (Martinez Lorenzo et al., 1998; Song et al., 2000). In der vorliegenden Studie wurde die Sekretion von sTRAIL durch T-Zellen direkt quantifiziert. Es konnte ein langsamer

Anstieg von sTRAIL in Kulturüberständen nach Stimulation von PBMC oder gereinigten T-Zellen mit PHA+IL-2 oder α CD3+ α C28 und IL-2 gezeigt werden. Die ausbleibende sTRAIL-Sekretion bei Stimulation nur mit PHA ohne IL-2 könnte darauf hinweisen, dass der IL-2 Signalweg wichtig für eine TRAIL-Induktion ist. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit den Resultaten von Snell et al., die zeigten, dass IL-2 die Menge an TRAIL-mRNA in PBMC erhöht (Snell et al., 1997). Auch Monleon et al. berichteten, dass CD59 cross-linking, welches ein Signal für die IL-2-Synthese gibt, zur Hochregulation des TRAIL-Proteins in überaktivierten humanen T-Zellen führt (Monleon et al., 2000). Da IL-2 einer der potentesten Wachstumsfaktoren für T-Zellen ist (Smith et al., 1979), liegt die Vermutung zunächst nahe, dass die Hochregulation von sTRAIL in Anwesenheit von IL-2 lediglich die erhöhten Zellzahlen in der Zellkultur reflektiert, nicht aber einen direkten Effekt von IL-2 auf die sTRAIL-Sekretion. Diese Vermutung konnte jedoch nicht bestätigt werden, da die überproportionale sTRAIL-Sekretion nicht mit der Zellzahl korrelierte. Obwohl die T-Zellaktivierung mit PHA und IL-2 zu einer nachweisbaren Proliferation dieser Zellen nach einem Intervall von mehr als 72h führte, war die absolute Anzahl lebender T-Zellen in den Kulturen bis zum Zeitpunkt von 72h gegenüber der Ausgangsmenge sogar leicht reduziert. Gründe dafür könnten in der Toxizität der Stimuli und Kulturbedingungen liegen. Erst nach einem Zeitraum von 96h nahm die absolute Zellzahl in den stimulierten Ansätzen allmählich zu.

T-Zellen gehören zu den effektivsten zytotoxischen Effektorzellen des Immunsystems. Sie eliminieren Zielzellen durch Perforin, CD95L, TNF oder Granzyme (Podack, 1995). Trotzdem zeigten diese Zellen in den hier beschriebenen Experimenten in vitro keine Erhöhung der membranständigen TRAIL-Expression durch die Aktivierung mit PHA+IL-2, was in Übereinstimmung mit den Forschungsergebnissen von Kayagaki et al. (Kayagaki et al., 1999) steht und vermuten lässt, dass die Sekretion von sTRAIL und die TRAIL-Oberflächenexpression unterschiedlich reguliert werden. Im Gegensatz dazu ist eine TRAIL-Hochregulation auf der Zelloberfläche nach Inkubation von aktivierten antigen-spezifischen T-Zelllinien (Wendling et al., 2000) oder frisch isolierten T-Zellen mit α CD3+ α C28 in Kombination mit IFN- β möglich (Kayagaki et al., 1999).

B-Zellen spielen eine Schlüsselrolle bei der humoralen Immunantwort. Die Aktivierung, Reifung und Differenzierung von B-Zellen wird u.a. durch das Zytokin IL-4 und durch ko-stimulatorische Moleküle wie CD40 reguliert (Jeppson et al., 1998). Deshalb wurden funktionell aktive anti-CD40-Antikörper und IL-4 verwendet, um gereinigte B-Zellen zu

stimulieren. Aktivierte B-Zellen begannen nach 72h in Kultur zu proliferieren, produzierten aber weder sTRAIL noch membranständiges TRAIL in nachweisbaren Konzentrationen. Laut Fanger et al. führt auch die Stimulation von dendritischen Zellen (DC) mit CD40L nicht zur Expression von TRAIL (Fanger et al., 1999; Vidalain et al., 2001). Im Gegensatz zu T-Zellen exprimieren auch frisch isolierte ex vivo B-Zellen überhaupt kein TRAIL auf ihrer Zelloberfläche. Dieser Unterschied zwischen T- und B-Zellen wurde zusätzlich durch eine real-time-PCR (Polymerasekettenreaktion) verifiziert (Daten nicht gezeigt), und bestätigt die von Zhao et al. postulierte Abwesenheit von TRAIL-mRNA in ruhenden humanen B-Zellen (Zhao et al., 1999). Im Mausmodell dagegen ist eine TRAIL-Expression auf der Oberfläche von transformierten und B220⁺-B-Zellen beschrieben worden, was auf mögliche Speziesunterschiede im B-Zell-System hinweist (Mariani und Krammer, 1998).

Bei der dritten Leukozytensubgruppe, auf die in dieser Studie ein Schwerpunkt gelegt wurde, handelt es sich um CD14⁺ Monozyten. Monozyten sezernierten nach Stimulation mit LPS in den ersten 24h kleine Mengen sTRAIL. Dieser Effekt wurde nur in isolierten Monozyten, nicht aber in PBMC beobachtet, was an der geringen Konzentration der Monozyten in PBMC-Proben (7,5-20%) liegen könnte. Da vielfach beschrieben wurde, dass Monozyten nach LPS-Aktivierung nicht in der Lage sind zu proliferieren (Langstein et al., 2000), erscheint es unwahrscheinlich, dass die gemessene sTRAIL-Sekretion durch eine erhöhte Monozytenanzahl in Kultur hervorgerufen wurde. Auch in anderen Studien wurde eine sTRAIL-Expression nach Stimulation mit LPS bestätigt (Halaas et al., 2000).

Wie auch schon bei T-Zellen konnte bei Monozyten direkt ex vivo eine TRAIL-Oberflächenexpression gemessen werden, was ebenfalls in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen steht (Halaas et al., 2000). Trotzdem führte die LPS-Stimulation von Monozyten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nicht zu einer verstärkten TRAIL-Oberflächenexpression. Die TRAIL-Oberflächenexpression nahm sowohl auf unstimulierten Monozyten zu, als auch auf solchen, die mit LPS stimuliert worden waren. Der Grund dafür war wahrscheinlich eine allgemeine Monozytenaktivierung durch die Kulturbedingungen, v.a. die Adhäsion an die Zellkulturplatten (Young et al., 2000). Die Ursache für widersprüchliche Daten zur LPS-induzierten TRAIL-Oberflächenexpression könnte in unterschiedlich konzentrierten LPS-Lösungen zu suchen sein (Griffith et al., 1999; Halaas et al., 2000). Halaas et al. beschrieben eine Erhöhung der bereits bestehenden TRAIL-Oberflächenexpression,

nachdem Monozyten mit einer sehr hohen Konzentration an LPS (100ng/ml) stimuliert worden waren, wobei große interindividuelle Unterschiede bestanden (n=5). Bei Makrophagen wurde dieser Effekt nicht beobachtet, und auch bei dendritischen Zellen konnte LPS (5ng/ml) TRAIL nicht hochregulieren (Fanger et al., 1999).

Anders als die eingesetzten spezifischen Stimuli, die auf eine einzelne Leukozytensubgruppe zielen, beeinflusst das pleiotrop wirksame IFN- β alle Subpopulationen (Oritani et al., 2001; Stark et al., 1998). IFN- β ist eines der effektivsten Medikamente in der Langzeittherapie der RRMS. Dabei ist der Wirkungsmechanismus dieses Zytokins bisher ungeklärt. Die kontroversen Ergebnisse vieler Studien verweisen darauf, dass IFN- β den AICD verstärkt (Kaser et al., 1999), nicht direkt Apoptose auslösen kann (Zipp et al., 2000a) oder sogar einen protektiven Effekt auf T-Zellen hat (Pilling et al., 1999). In der vorliegenden Studie sollte überprüft werden, ob die immunomodulatorischen und hypoproliferativen Effekte von IFN- β über eine Induktion von TRAIL vermittelt werden. In Experimenten mit PBMC war bereits eine dosisabhängige sTRAIL-Produktion nach Inkubation mit IFN- β nachgewiesen worden. Auch Transkriptionsanalysen anderer Autoren belegen eine Induktion von TRAIL durch IFN- β (Gong und Almasan, 2000). Die hier durchgeführten Analysen zeigten, dass trotz des pleiotropen Charakters von IFN- β (Oritani et al., 2001) ausschließlich Monozyten mit einer Sekretion von sTRAIL reagierten. Die durch IFN- β hervorgerufene sTRAIL-Sekretion war stark ausgeprägt, dosisabhängig und begann bereits in den ersten 24h nach Stimulation. Schon eine IFN- β -Konzentration, vergleichbar der Konzentration im Serum von MS-Patienten (68-86 IU/ml), die mit intramuskulärem IFN- β behandelt werden (Khan und Dhib-Jalbut, 1998), führte zu einem starken Anstieg von sTRAIL in den Zellkulturüberständen. Dieses Resultat steht in Übereinstimmung mit Ergebnissen einer weiterführenden Studie, die in vivo eine Induktion von sTRAIL bei MS-Patienten belegte, die mit IFN- β behandelt wurden (Wandinger et al., 2003). Mit einem DNA-Fragmentationstest nach Nicoletti (s.o.) konnte die biologische Wirksamkeit des abgegebenen sTRAIL nachgewiesen werden: Zellkulturüberstände von mit IFN- β behandelten Monozyten lösten Apoptose in suszeptiblen Jurkat-Zellen aus. Warum nur Monozyten nach IFN- β -Behandlung sTRAIL abgeben, nicht aber die anderen untersuchten Leukozytensubgruppen, sollte Gegenstand weiterführender Studien sein. Die Inkubation mit IFN- β erhöhte nach den ersten 24h auch die Oberflächenexpression von TRAIL auf Monozyten. Griffith et al. beschrieben ähnliche Ergebnisse nach Stimulation von Monozyten mit IFN- α oder durch virale Infektion (Griffith et al., 1999).

IFN- α und - β sind Typ-I-Interferone. Sie teilen eine ähnliche Sequenzhomologie, ähnliche Funktionen und die gleichen Oberflächenrezeptoren. Virale Infektionen von Zellen führen zu einer erhöhten Produktion von Interferonen und über diesen Mechanismus wahrscheinlich auch zur Hochregulation der TRAIL-Expression (Vidalain et al., 2001). Die IFN- β -induzierte TRAIL-Oberflächenexpression auf B-Zellen war zwar vergleichsweise gering, aber dennoch signifikant. Die Möglichkeit einer TRAIL-Expression auf der Oberfläche von nicht-transformierten B-Zellen ist in dieser Studie somit erstmalig nachgewiesen worden. In Übereinstimmung mit den Forschungsergebnissen von Kayagaki et al. (Kayagaki et al., 1999) konnte IFN- β alleine keine Erhöhung der membranständigen TRAIL-Expression auf T-Zellen induzieren.

Insgesamt weisen die präsentierten Daten auf ein komplexes Regulationsmuster von löslichem und oberflächengebundenem TRAIL hin. Beide Formen werden am stärksten durch IFN- β induziert. Andere Autoren beschreiben einen „cross-talk“, ein Interagieren von TRAIL und IFN- β , da beide Proteine ähnliche subzelluläre Signalkaskaden benutzen. Zudem ergaben Gen-Expressionsanalysen, dass nicht nur TRAIL durch IFN- β induziert wird, sondern, umgekehrt, IFN- β auch durch TRAIL (Kumar-Sinha et al., 2002). Hinsichtlich dieser Resultate könnte der immunomodulatorische Einfluss von IFN- β auf den Verlauf der MS durchaus auch durch den synergistischen Effekt dieser beiden Zytokine auf Entzündungsreaktionen erklärt werden.

Die logische Schlussfolgerung aus diesen Überlegungen wäre, dass die von Huang et al. (Huang et al., 2000) festgestellte erhöhte TRAIL-mRNA-Konzentration in peripheren Blutzellen von MS-Patienten eine adäquate Reaktion des Organismus zur Begrenzung der Entzündungsreaktion darstellt. Diese auf der mRNA-Ebene gezeigten Unterschiede, die Huang et al. selbst auf der Protein-Ebene nicht verifizieren konnte, ließen sich auch in dieser Arbeit nicht bestätigen. Bei der Expression von Oberflächen- und sTRAIL konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen MS-Patienten und gesunden Probanden festgestellt werden. Mögliche Gründe dafür sind:

- Um auch kleine Effekte statistisch erfassen zu können, wäre eine größere Zahl von Probanden nötig. Eine post hoc Powerkalkulation (Erdfelder, et al., 1996), unter der Annahme von Normalverteilung der Werte und gleicher Varianzen in der Gruppe der MS-Patienten und der Gruppe der gesunden Kontrollen wurde für (a) sTRAIL und (b) membrangebundenes TRAIL gerechnet. Diese ergab für (a) bei der PHA-Stimulation eine sehr geringe Effektstärke (0,02) und eine Power von nur 0,05. Bei der INF- β -Stimulation ergab sich eine große Effektstärke

(0,88) und eine moderate Power von 0,45. Daraus lässt sich mit einer a priori Poweranalyse (Erdfelder, et al., 1996) ableiten, dass bei einer Anzahl von 31 MS-Patienten und 31 gesunden Kontrollen ein möglicherweise tatsächlich bestehender Unterschied mit fünfprozentiger Irrtumswahrscheinlichkeit ($\alpha=0,05$; $1-\beta=0,95$) bei der INF- β -Stimulation nachweisbar wäre. Für (b) ergaben sich sehr geringe Effektstärken und eine sehr geringe Power.

- Eine Subanalyse bezüglich Alter, Geschlecht und EDSS-Wert der Patienten wäre nur mit einer größeren Zahl von Probanden sinnvoll.
- Möglicherweise bestehen Unterschiede nur für bestimmte Leukozyten-Subpopulationen, so dass sich verschiedene Effekte durch den Einsatz von PBMC überlagern.

Letztlich konnte die bereits erwähnte Studie von Wandinger et al. die von Huang et al. propagierten Unterschiede nicht reproduzieren, sondern zeigte ein umgekehrtes Verhältnis: 23 RRMS-Patienten (eine Subgruppe der untersuchten Kohorte, für die Serumproben vor Beginn der INF- β Therapie vorlagen) zeigten signifikant niedrigere sTRAIL-Serumkonzentrationen als 24 gesunde Probanden gleichen Alters und Geschlechts (matched sample). Dabei muss auch erwähnt werden, dass 19 der insgesamt 47 Patienten in der Studie von Huang et al. primär oder sekundär chronisch-progrediente MS aufwiesen und neun weitere RRMS-Patienten zum Studienzeitpunkt einen akuten Krankheitsschub durchliefen oder gerade gehabt hatten. Somit ist insgesamt von einem Patientenkollektiv mit wesentlich aktiverem Krankheitsgeschehen als in der vorliegenden Arbeit auszugehen.

Zudem wäre denkbar, dass Polymorphismen im TRAIL-Gen bei einem Vergleich der Expressionsstärke mitbeachtet werden müssen. In einer weiterführenden genetischen Studie (Weber et al., 2004) konnten in der Promotorregion des für TRAIL kodierenden Gens vier einfache Nukleotidpolymorphismen (single nucleotide polymorphisms, SNP) identifiziert werden. Trotzdem gab es zwischen diesen Genotypen keine Unterschiede in der Expression von mRNA und löslichem oder membranständige TRAIL-Protein (Daten nicht gezeigt).

Unabhängig von möglichen Unterschieden in der TRAIL-Expression zwischen Gesunden und MS-Kranken kann als erwiesen gelten, dass die Expression von TRAIL durch INF- β sowohl in vitro als auch in vivo drastisch gesteigert wird. Darauf deuten auch jüngste Ergebnisse aus der Längsschnittstudie von Wandinger et al. über INF- β -behandelte MS-Patienten hin (Wandinger et al., 2003). Patienten, die klinisch auf eine

IFN- β -Therapie ansprechen, so genannte „Responder“, zeigten frühzeitig anhaltend hohe Expressionslevel an TRAIL-mRNA und sTRAIL-Protein. Diese waren signifikant höher als bei unbehandelten Patienten oder gesunden Kontrollpersonen. Bei den so genannten „Non-Respondern“ blieb ein solcher Anstieg aus. Das Auftreten von IFN- β -neutralisierenden Antikörpern (NAB) dagegen führte zu einem späteren signifikanten Absinken der TRAIL-Expression. Somit kann TRAIL zumindest als ein Marker für das Ansprechen von Patienten auf eine IFN- β -Therapie betrachtet werden.

Ungeklärt bleibt die Frage, warum die Blockade von TRAIL im systemischen Kreislauf von Nagetieren zu einer rapiden Verschlechterung von EAE und kollageninduzierter Arthritis führen (Hilliard et al., 2001; Song et al., 2000). Wie einleitend beschrieben, war TRAIL zunächst als apoptoseinduzierender Mediator bekannt geworden (Walczak, 1999). Schnell stellte sich heraus, dass viele nicht-transformierte Zellen, u.a. auch humane antigenspezifische T-Zellen, nicht suszeptibel gegenüber TRAIL sind (Ashkenazi et al., 1999; Wendling et al., 2000). Auch in den Experimenten von Hilliard et al. und Song et al. war das Ausmaß an Apoptose von Entzündungszellen nicht verändert. Stattdessen gaben die Tierexperimente Hinweise darauf, dass TRAIL die T-Zell-Aktivierung und Proliferation inhibiert und somit eine Krankheitsexazerbation verhindert (Hilliard et al., 2001; Song et al., 2000). Darüber hinaus wurde ein supprimierender Effekt von TRAIL auf die Erythropoese beschrieben (Zamai et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass multimerisiertes TRAIL auch in humanen T-Zellen zu einer Inhibition der Aktivierung und Proliferation führt, und zugleich die Funktion von T-Effektorzellen einschränkt. Dazu wurde in An- und Abwesenheit von TRAIL eine Stimulation der T-Zellen mit α CD3 und α CD28 vorgenommen, welche eine Stimulation mit professionellen APC simuliert. Eine der Hauptfunktionen von CD4⁺ T- Effektorzellen besteht in der Sekretion von Zytokinen, wobei Th1-Zellen vor allem pro-inflammatorische Zytokine, Th2-Zellen hingegen anti-inflammatorische Zytokine produzieren (Janeway et al., 1999). TRAIL inhibierte die Aktivierung beider CD4⁺ T-Zell-Phänotypen, wie die verringerte Produktion von INF- γ und IL-4 nach TRAIL-Applikation in vitro belegt. Dieses Ergebnis widerspricht einer weit verbreiteten Hypothese, die besagt, dass die MS eine vornehmlich Th1-vermittelte Krankheit ist, und dass IFN- β das Verhältnis der beiden CD4⁺ T-Zell-Subtypen zugunsten der eher immunomodulatorisch wirkenden Th2-Zellen verschiebt (Yong et al., 1998). Gestützt wird die Hypothese des sogenannten Th1/Th2-Shifts u.a. dadurch, dass die IFN- β -Therapie zu einer Inhibition der IL-12 Sekretion führt (Wang et al., 2000). IL-

12 ist ein Zytokin, welches u.a. die Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen in Th1-Zellen forciert. (Janeway et al., 1999). Die hier vorgestellten Ergebnisse folgen nicht dieser Th1-Th2 Dichotomie, da TRAIL zu einer Reduktion der Proliferationsrate und der Zytokinproduktion für beide T-Zell-Phänotypen führte. Auch die Ergebnisse anderer Studien bekräftigen die Zweifel an einem strikten Th1/Th2-Shift als alleinige therapeutische Wirkung von IFN- β (Wandinger et al., 2001).

Der Grad der dosisabhängigen Inhibition der T-Zelllinien-Proliferation zeigte eine große Varianz und betrug nur in einem Drittel der Fälle 40% oder mehr. Dabei wurden keine systematischen signifikanten Unterschiede zwischen T-Zelllinien von MS-Patienten und Gesunden oder zwischen Linien verschiedener Antigenpezifität (TT versus MBP) beobachtet (Lunemann et al., 2002). Die inhibierende Wirkung von TRAIL ließ sich auch in lediglich mit α CD3+ α CD28 stimulierten T-Zellen nachweisen und war somit unabhängig von professionellen APC. Deswegen ist eine direkte Beeinflussung der T-Zellen durch TRAIL als wahrscheinlich anzusehen. Die genauere Erforschung des Signalwegs war Gegenstand weiterführender Studien (Lunemann et al., 2002). Diese zeigten, dass die TRAIL-vermittelte Hypoproliferation mit einer Herabregulation der CDK4 (Cyclin-dependent Kinase 4) verbunden ist. CDK4 reguliert das Voranschreiten des Zellzyklus von der G1 (Gap1) zur Synthesephase und könnte eine Rolle bei der Entstehung von T-Zell-Toleranz, z.B. der Anergie, spielen (Balomenos und Martinez, 2000). Im vorliegenden Fall wurde gezeigt, dass die Inkubation von T-Zellen mit TRAIL zur Inhibition des speicherabhängigen Kalziumeinstroms führt. Dieser stellt eine Grundvoraussetzung für die Lymphozytenaktivierung einschließlich der Zytokinproduktion und Zellproliferation dar (Qian und Weiss, 1997). Eine Inhibition des Kalziumstroms, die auch als Wirkung von TNF und CD95 beschrieben wurde, kann die T-Zellaktivierung supprimieren (Lewis und Cahalan, 1995). Mit Hilfe dieser Ergebnisse lässt sich die schon lange bekannte hypoproliferative Wirkung von IFN- β (Oritani et al., 2001) wesentlich besser erklären: IFN- β induziert TRAIL, welches durch die Inhibition des Kalziumeinstroms zur Hypoproliferation beiträgt.

Die vorliegenden Daten aus dieser und weiterführenden Studien legen nahe, dass TRAIL die Aktivierung von humanen T-Zellen herabreguliert und dabei weder Apoptose noch Anergie auslöst. Diese potentiell anti-inflammatorische Wirkung könnte von großer Bedeutung für das Finden neuer therapeutischer Strategien auf dem Gebiet der Autoimmunerkrankungen sein.

4.2. Die Expression, Regulation und mögliche Bedeutung von sCD95

Das CD95-Rezeptor/CD95-Ligand-Apoptosesystem wurde bereits in den frühen neunziger Jahren entdeckt (Itoh et al., 1991; Trauth et al., 1989). Somit lagen bereits zu Beginn dieser Studie Daten über die Expression und Regulation von membranständigem CD95 und CD95L vor: CD95 wird von verschiedenen Zellen exprimiert, vor allem aber von Thymozyten und T-Zellen, und durch IFN- γ sowie TNF bzw. Lymphozytenaktivierung hochreguliert (Klas et al., 1993; Nagata und Golstein, 1995). Von ruhenden B-Zellen wird CD95 erst nach Aktivierung durch CD40L oder Endotoxine exprimiert (Wang et al., 1996; Watanabe et al., 1995). Die CD95L-Expression ist begrenzt auf T-Zellen, NK-Zellen und Zellen in immunprivilegierten Geweben wie Auge und Hoden (Li-Weber und Krammer, 2003).

Gegenstand dieser Studie waren die Expression und Regulation von sCD95 aufgrund seiner besonderen apoptoseinhibierenden Rolle und der möglicherweise damit verbundenen verminderten Elimination aktivierter autoreaktiver T-Zellen in der MS-Pathogenese. Dazu wurde sCD95 mit einem sandwich-ELISA in den Zellkulturüberständen von PBMC und isolierten T-, B-Zellen und Monozyten quantifiziert. Allerdings waren die von den Zellen sezernierten sCD95-Konzentrationen unter der Nachweisgrenze des ELISA, so dass eine Azetonfällungs-Methode zur Konzentration der Zellkulturüberstände etabliert werden musste. Daraufhin wurden verschiedene Agenzien auf ihre Fähigkeit untersucht, die Produktion von sCD95 in PBMC zu induzieren. Zunächst konnte sCD95 nur in den mit T-Zell-Stimuli versetzten Ansätzen (PHA, PHA+IL-2 und α CD3+ α C28) nachgewiesen werden. Die Stimulation mit PHA in Abwesenheit von IL-2 führte zu einem verzögerten Anstieg der sCD95-Konzentration in den Zellkulturüberständen, was die Bedeutung von IL-2 bei der Aktivierung, Differenzierung und Proliferation von T-Zellen widerspiegelt (Janeway et al., 1999). Erst eine Verlaufsbeobachtung über sieben Tage zeigte, dass auch das Endotoxin SAC eine sCD95-Sekretion bei PBMC bewirkt. SAC ist ein hitzeinaktiviertes Staphylokokkus aureus Bakterienantigen, also ein Endotoxin und potenter Induktor von B-Zell-Proliferation (Li et al., 1997),

Die parallel geführten Proliferationstests belegten die Wirksamkeit der eingesetzten Stimuli, aber die sCD95-Produktion war nicht mit einer Erhöhung der absoluten Zellzahl in der Kultur korreliert. Beim Einsatz von T-Zell-Stimuli kam es erst nach 96h zu einem Anstieg der absoluten Zellzahl.

Über eine Sekretion von sCD95 durch PBMC war schon in früheren Arbeiten berichtet

worden (Kovacs et al., 1997; Papoff et al., 1996); zu Leukozyten-Subpopulationen lagen bislang lediglich Daten aus Experimenten mit T- und B-Tumorzelllinien vor (Knipping et al., 1995). Die hier durchgeführten Experimente mit isolierten T-, B-Zellen und Monozyten bestätigten die Vorexperimente und ergaben, dass aktivierte T-Zellen sCD95 abgeben können. Im Gegensatz dazu war im Überstand von ruhenden oder mit SAC stimulierten B-Zellen bzw. ruhenden oder mit LPS stimulierten Makrophagen kein sCD95 nachweisbar. Das Ergebnis der SAC-Stimulation aus den Experimenten mit getrennten Zellpopulationen widerspricht den Vorexperimenten mit PBMC. Dort hatte SAC nach einem Intervall von 120h zur erhöhten sCD95-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen geführt. Die Diskrepanz der vorliegenden Ergebnisse könnte damit erklärt werden, dass SAC durch „Toll-like-Rezeptoren“ Monozyten auf eine ähnliche Weise wie LPS aktivieren kann (Rabehi et al., 2001). Somit wäre denkbar, dass Monozyten durch Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine mit einiger Latenz T-Zellen aktivieren, die dann sCD95 abgeben. Weiterhin müssen proapoptotische Effekte von SAC auf reine B-Zell-Kulturen in Erwägung gezogen werden (Li et al., 1997). Deshalb bleibt offen, durch welche Zellpopulation und Mechanismen SAC tatsächlich sCD95-Konzentrationen in Zellkulturen erhöht, und ob normale humane B-Zellen in der Lage sind, sCD95 abzugeben. Forschung aus dem Bereich des systemischen Lupus erythematosus (SLE) zeigt, dass bei SLE-Patienten die sCD95-Serumkonzentration mit der Aktivität von B-Zellen, nicht aber T-Zellen korreliert (Bijl et al., 1998). Zusätzliche Experimente sind nötig, die Techniken wie intrazelluläre Durchflusszytometrie oder ELISPOT, weitere Stimuli sowie eine größere Anzahl an Probanden einschließen, um diese Frage endgültig zu beantworten.

Die Ergebnisse dieser und anderer Studien ergaben keine Hinweise auf einen Einfluss von IFN- β auf die Expression von CD95 bzw. sCD95. Im Überstand von Zellkulturen, die mit hohen IFN- β -Konzentrationen versetzt waren, konnte unabhängig von der Inkubationszeit kein sCD95 nachgewiesen werden. Außerdem war in Kulturüberständen von Zellen, die sowohl mit PHA+IL-2 als auch IFN- β inkubiert waren, tendenziell eher weniger sCD95 nachweisbar als in ausschließlich mit PHA+IL-2 stimulierten Zellkulturen. Wie oben bereits beschrieben hatte IFN- β einen antiproliferativen Effekt auf PBMC, was in Übereinstimmung mit vielen anderen Studien steht (Pette et al., 1997; Weber et al., 1999). Dabei ist zu betonen, dass IFN- β nicht zu einer Zunahme an Apoptose von T-Zellen führt (Zipp et al., 2000a). Auch zusätzliche ex vivo Studien konnten keine eindeutig verstärkte Expression von CD95-mRNA bei IFN- β -behandelten

MS-Patienten nachweisen (Gniadek et al., 2003), obwohl es unter IFN- β -Therapie bei MS-Patienten zu anfänglich steigenden und erst später abfallenden sCD95-Serumkonzentrationen kommt (Rep et al., 1999; Zipp et al., 1998d).

Die Vermutung, dass isolierte und mit T-Zell-Stimuli aktivierte T-Zellen sCD95 abgeben, konnte mit antigenspezifischen T-Zelllinien verifiziert werden. Sowohl die Stimulation mit α CD3+ α CD28 als auch mit bestrahlten APC und Antigen führte zur sCD95-Sekretion. Weder in den Zellkulturüberständen von T-Zellen+APC ohne Antigen noch von bestrahlten APC+Antigen ohne T-Zellen konnte sCD95 nachgewiesen werden. Daraus lässt sich schließen, dass die gemessenen sCD95-Konzentrationen tatsächlich von T-Zellen stammen und die Aktivierung Voraussetzung dafür ist. Da T-Zellen den größten Anteil an Lymphozyten (ca. 60%) ausmachen, ist somit auch wahrscheinlich, dass sie die Quelle für erhöhte sCD95-Spiegel bei MS-Patienten sind (Zipp et al., 1998d). Die erhöhten sCD95-Serumkonzentrationen bei MS-Patienten sind nicht nur mit dem Fortschreiten der Krankheit assoziiert, sondern das Serum von RRMS-Patienten mit hohen sCD95-Spiegeln konnte auch in vitro CD95L-vermittelte Apoptose in suszeptiblen Glioma-Zelllinien verhindern (Zipp et al., 1998c).

Eine mögliche Ursache für die erhöhten sCD95-Serumkonzentrationen bei MS-Patienten könnte eine generelle Dysregulation der T-Zellen mit vermehrter sCD95-Sekretion sein. Diese Hypothese konnte hier nicht bestätigt werden. Es gab keine signifikanten Unterschiede der absoluten oder auf die Zellzahl bezogenen sCD95-Konzentrationen in Zellkulturüberständen von PBMC von Gesunden oder MS-Patienten. Dafür können mehrere Ursachen in Betracht gezogen werden (siehe auch oben):

- Mangelnde statistische Power durch eine zu geringe Anzahl an gesunden Probanden und Patienten: Eine post-hoc Poweranalyse (unter der Annahme von Normalverteilung der Werte und gleicher Varianzen) ergab eine geringe Effektstärke (0,29) und eine geringe statistische Power ($1-\beta=0,10$ bei $\alpha=0,05$) für den Vergleich der sCD95-Sekretion nach PHA-Stimulation. Um bei der gegebenen geringen Effektstärke möglicherweise existierende tatsächliche Unterschiede zwischen Patienten und Gesunden mit einer fünfprozentigen Irrtumswahrscheinlichkeit ($\alpha=0,05$; $1-\beta=0,95$) nachweisen zu können, wären in jeder Gruppe 160 Probanden notwendig.
- Überlagerungseffekte durch Verwendung von PBMC anstelle reiner Subpopulationen und Artefakte durch in-vitro-Bedingungen.

- In Fibroblasten wurde unlängst CD95-mRNA nachgewiesen (Santiago et al., 2004). Diese nicht-leukozytäre Zellen könnten zu der systemischen sCD95-Produktion beitragen.

Abgesehen von den experimentellen Bedingungen müssen folgende Überlegungen berücksichtigt werden: (1) Es ist denkbar, dass die Erhöhung der sCD95-Serumkonzentrationen durch die verstärkte Aktivierung von T-Zellen verursacht wird, die sich in den Entzündungsherden der MS-Kranken, nicht aber im peripheren Blut befinden. (2) Inoue et al. (Inoue et al., 1997) berichteten, dass sich die erhöhten Konzentrationen von sCD95 nur in Serum und Liquor von Patienten mit aktiver MS nachweisen lassen, d.h. sofern neurologische Symptome in den letzten sechs Monaten neu aufgetreten sind. Es bestehe aber kein Unterschied zwischen inaktiver MS, gesunden Kontrollen und Patienten mit anderen neurologischen Krankheiten. Zwei andere Studien kamen zu ähnlichen Ergebnissen (Sakai et al., 1999) und fanden erhöhte sCD95-Konzentrationen im Liquor von Patienten mit chronisch-progredienter MS gegenüber Patienten mit RRMS (Boylan et al., 2001; Ciusani et al., 1998). (3) Erhöhte sCD95-Konzentrationen wurden auch im Serum von Patienten mit anderen entzündlichen oder konsumierenden Erkrankungen gefunden, u.a. bei anderen inflammatorischen ZNS-Erkrankungen (Ciusani et al., 1998), bei SLE (Bijl et al., 1998), Rheumatoider Arthritis (Cheng et al., 1994), HIV (Jiang et al., 1997), bei Karzinomen (Kimura et al., 1999) und Leukämien (Liu et al., 2002). Zumindest für den SLE ist ebenfalls eine Assoziation der sCD95-Produktion mit der Krankheitsaktivität beschrieben (Bijl et al., 1998). Im Falle von malignen Erkrankungen gilt es nahezu als erwiesen, dass die Sekretion von sCD95 durch Tumorzellen dem Schutz vor Tumorelimination durch ein intaktes Immunsystem dient (Liu et al., 2002).

Zusätzliche in-vitro-Studien mit PBMC von Patienten mit aktiver MS, MS in Remission und anderen Infektionskrankheiten, sowie die sCD95-Bestimmung im Liquor von Patienten mit aktiver und passiver MS wären nötig, um diese Frage vollends zu klären. Intrazelluläre Färbung und anschließende Durchflusszytometrie könnten die ELISA-Ergebnisse sinnvoll ergänzen.

Trotz der im Detail unterschiedlichen Teilergebnisse ist insgesamt davon auszugehen, dass erhöhte systemische sCD95-Serumkonzentrationen mit einer Verschlimmerung des inflammatorischen Krankheitsgeschehens einhergehen. Demnach müssten erniedrigte sCD95-Serumkonzentrationen einen positiven Effekt auf den Krankheitsverlauf haben. Im Falle der MS ist eine Erniedrigung der Schubrate während der Schwangerschaft mit

postpartaler Krankheitsexazerbation lange bekannt (Birk et al., 1990; Birk et al., 1988). Daraus ergab sich die folgende Frage: Ist die verminderte Krankheitsaktivität während der Schwangerschaft auch mit erniedrigten sCD95-Serumkonzentrationen und somit einer verbesserten Elimination autoreaktiver T-Zellen verbunden? Die im Rahmen dieser Studie durchgeführte Längsschnittuntersuchung von schwangeren MS-Patientinnen konnte weder vor, während noch nach der Schwangerschaft systematischen Veränderungen von sCD95-Serumkonzentrationen feststellen. Obwohl ein Fehler zweiter Art (die Wahrscheinlichkeit, die Nullhypothese anzunehmen, obwohl diese falsch ist) durch zu wenige oder unstrukturierte Messpunkte nicht auszuschließen ist, deutet die Bestätigung des Ergebnisses auch unter Verwendung statistischer Methoden wie Growth Curve Modeling (Singer und Willett, 2003) auf die Richtigkeit der Nullhypothese hin. Die Nullhypothese besagt, dass keine systematischen Unterschiede existieren. Trotzdem muss in Betracht gezogen werden, dass ein Teil der Patientinnen der Studie immunomodulatorische Medikamente erhalten hatte, die zu Veränderungen der sCD95-Serumkonzentration führen können.

Anderen Studien zufolge liegt dem protektiven Effekt der Schwangerschaft v.a. ein Wechsel des zellulären Immunsystems von Th1 zu Th2 zugrunde, ähnlich dem Th1/Th2-Shift unter IFN- β -Therapie. Ein solcher Immunshift findet in der Schwangerschaft wahrscheinlich zum Schutz des Föten vor Abstoßung statt, und die Besserung Th1-vermittelter Autoimmunkrankheiten wie MS wäre somit ein Nebeneffekt (Dudley et al., 1993; Hill et al., 1995). Ursache dieses Immunshifts sind wahrscheinlich erhöhte Östrogenspiegel während der Schwangerschaft. Pilotversuche mit Östriol als Therapeutikum für MS-Patientinnen zeigten bereits erste Erfolge (Sicotte et al., 2002; Soldan et al., 2003). Eine andere Studie ergab, dass 2-Methoxyestradiol, ein endogener Östrogenmetabolit, Apoptose durch Hochregulation von CD95 in Endothelzellen hervorrufen könnte (Yue et al., 1997).

4.3. Ausblick

Die Ergebnisse dieser und anderer Studien zeigen, dass TRAIL von aktivierten T-Zellen und von Monozyten unter der Wirkung von IFN- β verstärkt exprimiert wird. TRAIL wirkt hemmend auf die Proliferation und Aktivierung von humanen T-Zellen, löst dabei jedoch weder Apoptose noch Anergie aus. Diese immunomodulatorische Wirkung von TRAIL ist bedeutsam für das Verständnis der Pathogenese von Autoimmunkrankheiten

und deren Therapie. Während die Hochregulation von sTRAIL mit einer Besserung der MS-Symptomatik verbunden ist, gehen erhöhte sCD95-Serumkonzentrationen eher mit einer Verschlechterung einher. Der Grund dafür ist möglicherweise eine Blockade der CD95-vermittelten Apoptose autoreaktiver T-Zellen.

In den durchgeführten Experimenten wurde sCD95 ausschließlich von stimulierten T-Zellen sezerniert. IFN- β führte nicht zu einer Zunahme der sCD95-Expression in vitro. Weder im Vergleich zwischen MS-Kranken und Gesunden in vitro noch in der Untersuchung des Verlaufs der Schwangerschaft bei MS-Patientinnen in vivo fanden sich jedoch Veränderungen der sCD95-Sekretion.

5. Zusammenfassung

Apoptose ist eine der wichtigsten Formen des Zelltodes und spielt eine wesentliche Rolle in der Ontogenese, bei der Gewebshomöostase und bei degenerativen Erkrankungen. In den letzten Jahrzehnten wurden mehrere zu Apoptose führende Signalkaskaden entdeckt, die sich in mitochondriale (intrinsische) und rezeptorvermittelte (extrinsische) Mechanismen einteilen lassen. Zu den extrinsischen Apoptose-regulierenden Mechanismen gehört das CD95-Rezeptor/CD95-Ligand-System und das in seiner Bedeutung noch relativ wenig verstandene TRAIL-Rezeptor/TRAIL-System, deren Liganden beide Mitglieder der großen Gruppe der Tumor-Nekrose-Faktor-Familie sind.

Im Bereich der Autoimmunkrankheiten, wie z.B. der Multiplen Sklerose (MS), kommt es zu einer fehlgesteuerten Immunantwort mit Aktivierung und Persistenz autoreaktiver T-Zellen, bei der das CD95-Rezeptor/CD95-Ligand- und TRAIL-Rezeptor/TRAIL-System eine Rolle spielen könnten. Während diese T-Zellen im gesunden Individuum im Rahmen des aktivierungsinduzierten Zelltodes (AICD) apoptotisch abgeschaltet werden, tragen sie bei der MS zu disseminiert auftretenden, vernarbenden Entzündungsherden in der weißen Substanz des ZNS und somit zu zentralen Paresen, Sensibilitäts- und Koordinationsstörungen bei. Der Krankheitsverlauf der MS kann langfristig durch den Einsatz des immunomodulatorischen Therapeutikums INF- β und kurzfristig zum Beispiel durch den Einfluss einer Schwangerschaft abgemildert werden. Die Gründe dafür sind nicht vollständig geklärt.

Eine mögliche Ursache für eine mangelhafte Begrenzung von T-Zell-Reaktionen, die sich gegen körpereigene Proteine richten, könnte ein Überschuss an löslichem CD95-Rezeptor (sCD95) sein, der an CD95L bindet und damit die Apoptose aktivierter autoreaktiver T-Zellen verhindert. Lösliches TRAIL (sTRAIL) löst Apoptose in vielen Tumorzellen, aber nicht in T-Zellen und den meisten anderen nicht-transformierten Zellen aus. Allerdings gibt es Hinweise aus Tierversuchen, dass eine Blockade von TRAIL zur Exazerbation von Autoimmunphänomenen führt, ohne Apoptoseprozesse zu beeinflussen.

In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb die Expression und Regulation sowohl von sCD95 als auch von sTRAIL und membranständigem TRAIL in Leukozytensubpopulationen von gesunden Probanden und Patienten mit schubförmig remittierender MS untersucht. Dabei waren die Wirkungen verschiedener Stimuli,

insbesondere von IFN- β , der protektive Einfluss von Schwangerschaft und apoptoseunabhängige Effekte von TRAIL zentrale Fragestellungen dieser Studie.

Die Untersuchungen mit magnetisch gereinigten humanen Leukozytensubpopulationen zeigten, dass sCD95 lediglich von aktivierten humanen T-Zellen, nicht aber von B-Zellen oder Monozyten sezerniert wird. Die Vitalität der eingesetzten Zellpopulationen wurde jeweils durch Proliferationstests bzw. im Durchflusszytometer nachgewiesen. TRAIL wurde vor allem von mit IFN- β stimulierten Monozyten sezerniert und auf der Zelloberfläche exprimiert. Die dosisabhängig produzierten sTRAIL-Konzentrationen waren so hoch, dass sie Apoptose in suszeptiblen Tumorzellen auszulösen vermochten. In geringerem Umfang waren auch gereinigte aktivierte T-Zellen und aktivierte antigenspezifische T-Zellen aus T-Zell-Kulturen in der Lage, sTRAIL zu sezernieren; eine Oberflächenexpression kann allerdings nur durch eine Kombination von T-Zell-Stimuli mit IFN- β erreicht werden.

sTRAIL führte zu einer signifikanten Inhibition der Proliferation in humanen (auto)antigenspezifischen T-Zelllinien. Ebenso kam es zu einer Abnahme der Produktion von Th1- und Th2-spezifischen Zytokinen (IFN- α und IL-4). Weder für die sCD95- noch für die sTRAIL-Sekretion oder TRAIL-Oberflächenexpression wurden Unterschiede zwischen gesunden Probanden und MS-Patienten nachgewiesen. Ebenso konnten keine veränderten sCD95-Serumkonzentrationen bei 69 schwangeren RRMS-Patientinnen einer Langzeitstudie gefunden werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen ein komplexes Regulations- und Expressionsmuster von sCD95 und TRAIL in T-, B-Zellen und Monozyten, ohne jedoch Anhaltspunkte für Unterschiede zwischen MS-Patienten und Gesunden zu liefern. Allerdings ergaben sich wichtige Hinweise darauf, dass der protektive immunomodulatorische Effekt einer systemischen IFN- β -Therapie bei MS durch TRAIL vermittelt werden könnte: IFN- β bewirkte eine dosisabhängige Steigerung der TRAIL-Expression von Monozyten. Erhöhte TRAIL-Konzentrationen könnten zur Inhibition der Aktivierung (auto)antigenspezifischer T-Zellen und somit zur Begrenzung autoreaktiver Entzündungsprozesse beitragen. Weiterführende Experimente haben bereits gezeigt, dass es auch in vivo unter IFN- β -Therapie zu einem signifikanten Anstieg der TRAIL-Expression kommt, der mit der Besserung der klinischen Symptome der MS korreliert.

6. Literaturverzeichnis

- (1995): Interferon beta-1b in the treatment of multiple sclerosis: final outcome of the randomized controlled trial. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group, *Neurology* 45 [7], Seite 1277-85.
- (2001): PRISMS-4: Long-term efficacy of interferon-beta-1a in relapsing MS, *Neurology* 56 [12], Seite 1628-36.
- Ashkenazi, A. (2002): Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily, *Nat Rev Cancer* 2 [6], Seite 420-30.
- Ashkenazi, A.; Pai, R. C.; Fong, S.; Leung, S.; Lawrence, D. A.; Marsters, S. A.; Blackie, C.; Chang, L.; McMurtrey, A. E.; Hebert, A.; DeForge, L.; Koumenis, I. L.; Lewis, D.; Harris, L.; Bussiere, J.; Koeppen, H.; Shahrokh, Z. und Schwall, R. H. (1999): Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand, *J Clin Invest* 104 [2], Seite 155-62.
- Ault, K.A. und Mitchell, J.G. (1992): Analysis of platelets., Laerum, O.D. und Bjerknes, R., *Flow cytometry in hematology*. Seite 153-163, Academic Press, London - San Diego - New York.
- Balomenos, D. und Martinez, A. C. (2000): Cell-cycle regulation in immunity, tolerance and autoimmunity, *Immunol Today* 21 [11], Seite 551-5.
- Bechmann, I.; Mor, G.; Nilsen, J.; Eliza, M.; Nitsch, R. und Naftolin, F. (1999): FasL (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain: evidence for the existence of an immunological brain barrier, *Glia* 27 [1], Seite 62-74.
- Bechmann, I.; Steiner, B.; Gimsa, U.; Mor, G.; Wolf, S.; Beyer, M.; Nitsch, R. und Zipp, F. (2002): Astrocyte-induced T cell elimination is CD95 ligand dependent, *J Neuroimmunol*, 132 [1-2], Seite 60-65.
- Bijl, M.; van Lopik, T.; Limburg, P. C.; Spronk, P. E.; Jaegers, S. M.; Aarden, L. A.; Smeenk, R. J. und Kallenberg, G. G. (1998): Do elevated levels of serum-soluble fas contribute to the persistence of activated lymphocytes in systemic lupus erythematosus?, *J Autoimmun* 11 [5], Seite 457-63.
- Birk, K.; Ford, C.; Smeltzer, S.; Ryan, D.; Miller, R. und Rudick, R. A. (1990): The clinical course of multiple sclerosis during pregnancy and the puerperium, *Arch Neurol* 47 [7], Seite 738-42.
- Birk, K.; Smeltzer, S. C. und Rudick, R. (1988): Pregnancy and multiple sclerosis, *Semin Neurol* 8 [3], Seite 205-13.
- Bodmer, J. L.; Holler, N.; Reynard, S.; Vinciguerra, P.; Schneider, P.; Juo, P.; Blenis, J. und Tschopp, J. (2000): TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8, *Nat Cell Biol* 2 [4], Seite 241-3.
- Borner, C. (2003): The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions, *Mol Immunol* 39 [11], Seite 615-47.
- Boylan, M. T.; Crockard, A. D.; McDonnell, G. V.; McMillan, S. A. und Hawkins, S. A. (2001): Serum and cerebrospinal fluid soluble Fas levels in clinical subgroups of multiple sclerosis, *Immunol Lett* 78 [3], Seite 183-7.
- Cascino, I.; Fiucci, G.; Papoff, G. und Ruberti, G. (1995): Three functional soluble forms of the human apoptosis-inducing Fas molecule are produced by alternative splicing, *J Immunol* 154 [6], Seite 2706-13.
- Chan, F. K.; Chun, H. J.; Zheng, L.; Siegel, R. M.; Bui, K. L. und Lenardo, M. J. (2000): A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling, *Science* 288 [5475], Seite 2351-4.
- Cheng, J.; Zhou, T.; Liu, C.; Shapiro, J. P.; Brauer, M. J.; Kiefer, M. C.; Barr, P. J. und Mountz, J. D. (1994): Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form

- of the Fas molecule, *Science* 263 [5154], Seite 1759-62.
- Ciusani, E.; Frigerio, S.; Gelati, M.; Corsini, E.; Dufour, A.; Nespolo, A.; La Mantia, L.; Milanese, C.; Massa, G. und Salmaggi, A. (1998): Soluble Fas (Apo-1) levels in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients, *J Neuroimmunol* 82 [1], Seite 5-12.
- Compston, A. und Sadovnick, A. D. (1992): Epidemiology and genetics of multiple sclerosis, *Curr Opin Neurol Neurosurg* 5 [2], Seite 175-81.
- Crawford, M. P.; Yan, S. X.; Ortega, S. B.; Mehta, R. S.; Hewitt, R. E.; Price, D. A.; Stastny, P.; Douek, D. C.; Koup, R. A.; Racke, M. K. und Karandikar, N. J. (2004): High prevalence of autoreactive, neuroantigen-specific CD8+ T cells in multiple sclerosis revealed by novel flow cytometric assay, *Blood* 103 [11], Seite 4222-31.
- Dorr, J.; Bechmann, I.; Waiczies, S.; Aktas, O.; Walczak, H.; Krammer, P. H.; Nitsch, R. und Zipp, F. (2002): Lack of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand but presence of its receptors in the human brain, *J Neurosci* 22 [4], Seite RC209.
- Dowling, P.; Husar, W.; Menonna, J.; Donnenfeld, H.; Cook, S. und Sidhu, M. (1997): Cell death and birth in multiple sclerosis brain, *J Neurol Sci* 149 [1], Seite 1-11.
- D'Souza, S. D.; Bonetti, B.; Balasingam, V.; Cashman, N. R.; Barker, P. A.; Troutt, A. B.; Raine, C. S. und Antel, J. P. (1996): Multiple sclerosis: Fas signaling in oligodendrocyte cell death, *J Exp Med* 184 [6], Seite 2361-70.
- Dudley, D. J.; Chen, C. L.; Mitchell, M. D.; Daynes, R. A. und Araneo, B. A. (1993): Adaptive immune responses during murine pregnancy: pregnancy-induced regulation of lymphokine production by activated T lymphocytes, *Am J Obstet Gynecol* 168 [4], Seite 1155-63.
- Eckhardt, R. (1991): Durchflußzytometrie, eine schnelle und einfache Methode zur Analyse großer Zellzahlen., *Lab Med* 15, Seite 563-569.
- Ehrlich, S.; Noam, G. G.; Lyoo, I. K.; Kwon, B. J.; Clark, M. A. und Renshaw, P. F. (2003): Subanalysis of the location of white matter hyperintensities and their association with suicidality in children and youth, *Ann N Y Acad Sci* 1008, Seite 265-8.
- Ehrlich, S.; Noam, G. G.; Lyoo, I. K.; Kwon, B. J.; Clark, M. A. und Renshaw, P. F. (2004): White matter hyperintensities and their associations with suicidality in psychiatrically hospitalized children and adolescents, *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 43 [6], Seite 770-6.
- Ehrlich, S.; Breeze, J. L.; Hesdorffer, D. C.; Noam, G. G.; Hong, X.; Alban, R. L.; Davis, S. E. und Renshaw, P. F. (2005): White matter hyperintensities and their association with suicidality in depressed young adults, *J Affect Disord* 86 [2-3], Seite 281-7.
- Emery, J. G.; McDonnell, P.; Burke, M. B.; Deen, K. C.; Lyn, S.; Silverman, C.; Dul, E.; Appelbaum, E. R.; Eichman, C.; DiPrinzio, R.; Dodds, R. A.; James, I. E.; Rosenberg, M.; Lee, J. C. und Young, P. R. (1998): Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL, *J Biol Chem* 273 [23], Seite 14363-7.
- Erdfelder, E.; Faul, F. und Buchner, A. (1996): G*Power: A general power analysis program, *Behavior Research Methods, Instruments, & Computers* 28, Seite 1-11.
- Fanger, N. A.; Maliszewski, C. R.; Schooley, K. und Griffith, T. S. (1999): Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), *J Exp Med* 190 [8], Seite 1155-64.
- Fowlkes, B. J.; Schwartz, R. H. und Pardoll, D. M. (1988): Deletion of self-reactive thymocytes occurs at a CD4+8+ precursor stage, *Nature* 334 [6183], Seite 620-3.
- Gelati, M.; Corsini, E.; De Rossi, M.; Masini, L.; Bernardi, G.; Massa, G.; Boiardi, A.

- und Salmaggi, A. (2002): Methylprednisolone acts on peripheral blood mononuclear cells and endothelium in inhibiting migration phenomena in patients with multiple sclerosis, *Arch Neurol* 59 [5], Seite 774-80.
- Gniadek, P.; Aktas, O.; Wandinger, K. P.; Bellmann-Strobl, J.; Wengert, O.; Weber, A.; von Wussow, P.; Obert, H. J. und Zipp, F. (2003): Systemic IFN-beta treatment induces apoptosis of peripheral immune cells in MS patients, *J Neuroimmunol* 137 [1-2], Seite 187-96.
- Goebels, N.; Hofstetter, H.; Schmidt, S.; Brunner, C.; Wekerle, H. und Hohlfeld, R. (2000): Repertoire dynamics of autoreactive T cells in multiple sclerosis patients and healthy subjects: epitope spreading versus clonal persistence, *Brain* 123 [3], Seite 508-18.
- Gong, B. und Almasan, A. (2000): Genomic organization and transcriptional regulation of human Apo2/ TRAIL gene, *Biochem Biophys Res Commun* 278 [3], Seite 747-52.
- Greaves, M.; Janossy, G. und Doenhoff, M. (1974): Selective triggering of human T and B lymphocytes in vitro by polyclonal mitogens, *J Exp Med* 140 [1], Seite 1-18.
- Green, D. R.; Droin, N. und Pinkoski, M. (2003): Activation-induced cell death in T cells, *Immunol Rev* 193, Seite 70-81.
- Griffith, T. S.; Wiley, S. R.; Kubin, M. Z.; Sedger, L. M.; Maliszewski, C. R. und Fanger, N. A. (1999): Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor- related cytokine, TRAIL, *J Exp Med* 189 [8], Seite 1343-54.
- Haines, J. L.; Terwedow, H. A.; Burgess, K.; Pericak-Vance, M. A.; Rimmler, J. B.; Martin, E. R.; Oksenberg, J. R.; Lincoln, R.; Zhang, D. Y.; Banatao, D. R.; Gatto, N.; Goodkin, D. E. und Hauser, S. L. (1998): Linkage of the MHC to familial multiple sclerosis suggests genetic heterogeneity. The Multiple Sclerosis Genetics Group, *Hum Mol Genet* 7 [8], Seite 1229-34.
- Halaas, O.; Vik, R.; Ashkenazi, A. und Espevik, T. (2000): Lipopolysaccharide induces expression of APO2 ligand/TRAIL in human monocytes and macrophages, *Scand J Immunol* 51 [3], Seite 244-50.
- Hartung, H. P.; Gonsette, R.; Konig, N.; Kwiecinski, H.; Guseo, A.; Morrissey, S. P.; Krapf, H. und Zwingers, T. (2002): Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial, *Lancet* 360 [9350], Seite 2018-25.
- Hill, J. A.; Polgar, K. und Anderson, D. J. (1995): T-helper 1-type immunity to trophoblast in women with recurrent spontaneous abortion, *Jama* 273 [24], Seite 1933-6.
- Hillert, J. und Masterman, T. (2001): The genetics of multiple sclerosis, Cook, S.D., *Handbook of multiplesclerosis*. 3rd ed. Seite 33-65, Marcel Dekker, New York.
- Hilliard, B.; Wilmen, A.; Seidel, C.; Liu, T. S.; Goke, R. und Chen, Y. (2001): Roles of TNF-related apoptosis-inducing ligand in experimental autoimmune encephalomyelitis, *J Immunol* 166 [2], Seite 1314-9.
- Huang, W. X.; Huang, M. P.; Gomes, M. A. und Hillert, J. (2000): Apoptosis mediators fasL and TRAIL are upregulated in peripheral blood mononuclear cells in MS, *Neurology* 55 [7], Seite 928-34.
- Inoue, A.; Koh, C. S.; Sakai, T.; Yamazaki, M.; Yanagisawa, N.; Usuku, K. und Osame, M. (1997): Detection of the soluble form of the Fas molecule in patients with multiple sclerosis and human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy, *J Neuroimmunol* 75 [1-2], Seite 141-6.
- Irmeler, M.; Thome, M.; Hahne, M.; Schneider, P.; Hofmann, K.; Steiner, V.; Bodmer, J. L.; Schroter, M.; Burns, K.; Mattmann, C.; Rimoldi, D.; French, L. E. und Tschopp, J. (1997): Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP, *Nature*

- 388 [6638], Seite 190-5.
- Itoh, N.; Yonehara, S.; Ishii, A.; Yonehara, M.; Mizushima, S.; Sameshima, M.; Hase, A.; Seto, Y. und Nagata, S. (1991): The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis, *Cell* 66 [2], Seite 233-43.
- Jacobs, L. D.; Beck, R. W.; Simon, J. H.; Kinkel, R. P.; Brownschidle, C. M.; Murray, T. J.; Simonian, N. A.; Slasor, P. J. und Sandrock, A. W. (2000): Intramuscular interferon beta-1a therapy initiated during a first demyelinating event in multiple sclerosis. CHAMPS Study Group, *N Engl J Med* 343 [13], Seite 898-904.
- Janeway, C.A.; Travers, P.; Walport, M. und Capra, J.D. (1999): Immunobiology: the immune system in health and disease, Janeway, C., Elsevier Science Ltd/Garland Publishing, London.
- Jenkinson, E. J.; Kingston, R.; Smith, C. A.; Williams, G. T. und Owen, J. J. (1989): Antigen-induced apoptosis in developing T cells: a mechanism for negative selection of the T cell receptor repertoire, *Eur J Immunol* 19 [11], Seite 2175-7.
- Jeppson, J. D.; Patel, H. R.; Sakata, N.; Domenico, J.; Terada, N. und Gelfand, E. W. (1998): Requirement for dual signals by anti-CD40 and IL-4 for the induction of nuclear factor-kappa B, IL-6, and IgE in human B lymphocytes, *J Immunol* 161 [4], Seite 1738-42.
- Jiang, J. D.; Schlesinger, M.; Sacks, H.; Mildvan, D.; Roboz, J. P. und Bekesi, J. G. (1997): Concentrations of soluble CD95 and CD8 antigens in the plasma and levels of CD8+CD95+, CD8+CD38+, and CD4+CD95+ T cells are markers for HIV-1 infection and clinical status, *J Clin Immunol* 17 [2], Seite 185-92.
- Jo, M.; Kim, T. H.; Seol, D. W.; Esplen, J. E.; Dorko, K.; Billiar, T. R. und Strom, S. C. (2000): Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor- related apoptosis-inducing ligand, *Nat Med* 6 [5], Seite 564-7.
- Johnson, K. P.; Brooks, B. R.; Cohen, J. A.; Ford, C. C.; Goldstein, J.; Lisak, R. P.; Myers, L. W.; Panitch, H. S.; Rose, J. W. und Schiffer, R. B. (1995): Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group, *Neurology* 45 [7], Seite 1268-76.
- Johnson, K. P.; Brooks, B. R.; Cohen, J. A.; Ford, C. C.; Goldstein, J.; Lisak, R. P.; Myers, L. W.; Panitch, H. S.; Rose, J. W.; Schiffer, R. B.; Vollmer, T.; Weiner, L. P. und Wolinsky, J. S. (1998): Extended use of glatiramer acetate (Copaxone) is well tolerated and maintains its clinical effect on multiple sclerosis relapse rate and degree of disability. Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group, *Neurology* 50 [3], Seite 701-8.
- Kaser, A.; Deisenhammer, F.; Berger, T. und Tilg, H. (1999): Interferon-beta 1b augments activation-induced T-cell death in multiple sclerosis patients, *Lancet* 353 [9162], Seite 1413-4.
- Kastrukoff, L.F. und Rice, G.P.A. (1997): Virology, Paty, D. W. und Ebers, G. C., Multiple sclerosis Seite 370-402, FA Davis, Philadelphia.
- Kayagaki, N.; Yamaguchi, N.; Nakayama, M.; Eto, H.; Okumura, K. und Yagita, H. (1999): Type I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: A novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs, *J Exp Med* 189 [9], Seite 1451-60.
- Kerr, J. F.; Winterford, C. M. und Harmon, B. V. (1994): Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy, *Cancer* 73 [8], Seite 2013-26.
- Kerr, J. F.; Wyllie, A. H. und Currie, A. R. (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br J Cancer* 26

- [4], Seite 239-57.
- Khan, O. A. und Dhib-Jalbut, S. S. (1998): Serum interferon beta-1a (Avonex) levels following intramuscular injection in relapsing-remitting MS patients, *Neurology* 51 [3], Seite 738-42.
- Kieseier, B. C. und Hartung, H. P. (2003): Current disease-modifying therapies in multiple sclerosis, *Semin Neurol* 23 [2], Seite 133-46.
- Kimura, M.; Tomita, Y.; Imai, T.; Saito, T.; Katagiri, A.; Tanikawa, T.; Takeda, M. und Takahashi, K. (1999): Significance of serum-soluble CD95 (Fas/APO-1) on prognosis in renal cell cancer patients, *Br J Cancer* 80 [10], Seite 1648-51.
- Klas, C.; Debatin, K. M.; Jonker, R. R. und Krammer, P. H. (1993): Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells, *Int Immunol* 5 [6], Seite 625-30.
- Knipping, E.; Debatin, K. M.; Stricker, K.; Heilig, B.; Eder, A. und Krammer, P. H. (1995): Identification of soluble APO-1 in supernatants of human B- and T-cell lines and increased serum levels in B- and T-cell leukemias, *Blood* 85 [6], Seite 1562-9.
- Kovacs, B.; Szentendrei, T.; Bednarek, J. M.; Pierson, M. C.; Mountz, J. D.; Vogelgesang, S. A. und Tsokos, G. C. (1997): Persistent expression of a soluble form of Fas/APO1 in continuously activated T cells from a patient with SLE, *Clin Exp Rheumatol* 15 [1], Seite 19-23.
- Krammer, P. H. (1999): CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die, *Adv Immunol* 71, Seite 163-210.
- Krueger, A.; Fas, S. C.; Baumann, S. und Krammer, P. H. (2003): The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis, *Immunol Rev* 193, Seite 58-69.
- Kumar-Sinha, C.; Varambally, S.; Sreekumar, A. und Chinnaiyan, A. M. (2002): Molecular Cross-talk between the TRAIL and Interferon Signaling Pathways, *J Biol Chem* 277 [1], Seite 575-85.
- Kurtzke, J.F. (1983): Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS), *Neurology* 33 [11], Seite 1444-52.
- Langstein, J.; Becke, F. M.; Sollner, L.; Krause, G.; Brockhoff, G.; Kreutz, M.; Andreesen, R. und Schwarz, H. (2000): Comparative analysis of CD137 and LPS effects on monocyte activation, survival, and proliferation, *Biochem Biophys Res Commun* 273 [1], Seite 117-22.
- Leithauser, F.; Dhein, J.; Mechttersheimer, G.; Koretz, K.; Bruderlein, S.; Henne, C.; Schmidt, A.; Debatin, K. M.; Krammer, P. H. und Moller, P. (1993): Constitutive and induced expression of APO-1, a new member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily, in normal and neoplastic cells, *Lab Invest* 69 [4], Seite 415-29.
- Lenardo, M.; Chan, K. M.; Hornung, F.; McFarland, H.; Siegel, R.; Wang, J. und Zheng, L. (1999): Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment, *Annu Rev Immunol* 17, Seite 221-53.
- Lewis, R. S. und Cahalan, M. D. (1995): Potassium and calcium channels in lymphocytes, *Annu Rev Immunol* 13, Seite 623-53.
- Li, L.; Krajewski, S.; Reed, J. C. und Choi, Y. S. (1997): The apoptosis and proliferation of SAC-activated B cells by IL-10 are associated with changes in Bcl-2, Bcl-xL, and Mcl-1 expression, *Cell Immunol* 178 [1], Seite 33-41.
- Liu, C.; Cheng, J. und Mountz, J. D. (1995): Differential expression of human Fas mRNA species upon peripheral blood mononuclear cell activation, *Biochem J* 310 (Pt 3), Seite 957-63.
- Liu, J. H.; Wei, S.; Lamy, T.; Li, Y.; Epling-Burnette, P. K.; Djeu, J. Y. und Loughran, T. P., Jr. (2002): Blockade of Fas-dependent apoptosis by soluble Fas in LGL

- leukemia, *Blood* 100 [4], Seite 1449-53.
- Li-Weber, M. und Krammer, P. H. (2003): Function and regulation of the CD95 (APO-1/Fas) ligand in the immune system, *Semin Immunol* 15 [3], Seite 145-57.
- Loo, D. T. und Rillema, J. R. (1998): Measurement of cell death, *Methods Cell Biol* 57, Seite 251-64.
- Lublin, F. D. und Reingold, S. C. (1996): Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis, *Neurology* 46 [4], Seite 907-11.
- Lucchinetti, C. F.; Brueck, W.; Rodriguez, M. und Lassmann, H. (1998): Multiple sclerosis: lessons from neuropathology, *Semin Neurol* 18 [3], Seite 337-49.
- Lunemann, J. D.; Waiczies, S.; Ehrlich, S.; Wendling, U.; Seeger, B.; Kamradt, T. und Zipp, F. (2002): Death ligand TRAIL induces no apoptosis but inhibits activation of human (auto)antigen-specific T cells, *J Immunol* 168 [10], Seite 4881-8.
- Macchi, B.; Matteucci, C.; Nocentini, U.; Caltagirone, C. und Mastino, A. (1999): Impaired apoptosis in mitogen-stimulated lymphocytes of patients with multiple sclerosis, *Neuroreport* 10 [2], Seite 399-402.
- MacEwan, D. J. (2002): TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences, *Cell Signal* 14 [6], Seite 477-92.
- MacFarlane, M.; Cohen, G. M. und Dickens, M. (2000): JNK (c-Jun N-terminal kinase) and p38 activation in receptor-mediated and chemically-induced apoptosis of T-cells: differential requirements for caspase activation, *Biochem J* 348 Pt 1, Seite 93-101.
- Mariani, S. M. und Krammer, P. H. (1998): Differential regulation of TRAIL and CD95 ligand in transformed cells of the T and B lymphocyte lineage, *Eur J Immunol* 28 [3], Seite 973-82.
- Markovic-Plese, S. und McFarland, H. F. (2001): Immunopathogenesis of the multiple sclerosis lesion, *Curr Neurol Neurosci Rep* 1 [3], Seite 257-62.
- Martin, R. und McFarland, H. F. (1995): Immunological aspects of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis, *Crit Rev Clin Lab Sci* 32 [2], Seite 121-82.
- Martinez Lorenzo, M. J.; Alava, M. A.; Gamen, S.; Kim, K. J.; Chuntharapai, A.; Pineiro, A.; Naval, J. und Anel, A. (1998): Involvement of APO2 ligand/TRAIL in activation-induced death of Jurkat and human peripheral blood T cells, *Eur J Immunol* 28 [9], Seite 2714-25.
- Martinez Lorenzo, M. J.; Anel, A.; Gamen, S.; Monleon, I.; Lasier, P.; Larrad, L.; Pineiro, A.; Alava, M. A. und Naval, J. (1999): Activated human T cells release bioactive Fas ligand and APO2 ligand in microvesicles, *J Immunol* 163 [3], Seite 1274-81.
- McDonald, W. I.; Compston, A.; Edan, G.; Goodkin, D.; Hartung, H. P.; Lublin, F. D.; McFarland, H. F.; Paty, D. W.; Polman, C. H.; Reingold, S. C.; Sandberg-Wollheim, M.; Sibley, W.; Thompson, A.; van den Noort, S.; Weinshenker, B. Y. und Wolinsky, J. S. (2001): Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis, *Ann Neurol* 50 [1], Seite 121-7.
- Melino, G. (2001): The Sirens' song, *Nature* 412 [6842], Seite 23.
- Monleon, I.; Martinez Lorenzo, M. J.; Anel, A.; Lasier, P.; Larrad, L.; Pineiro, A.; Naval, J. und Alava, M. A. (2000): CD59 cross-linking induces secretion of APO2 ligand in overactivated human T cells, *Eur J Immunol* 30 [4], Seite 1078-87.
- Muller, M.; Wilder, S.; Bannasch, D.; Israeli, D.; Lehlbach, K.; Li-Weber, M.;

- Friedman, S. L.; Galle, P. R.; Stremmel, W.; Oren, M. und Krammer, P. H. (1998): p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs, *J Exp Med* 188 [11], Seite 2033-45.
- Nagata, S. (1997): Apoptosis by death factor, *Cell* 88 [3], Seite 355-65.
- Nagata, S. (1998): Human autoimmune lymphoproliferative syndrome, a defect in the apoptosis-inducing Fas receptor: a lesson from the mouse model, *J Hum Genet* 43 [1], Seite 2-8.
- Nagata, S. und Golstein, P. (1995): The Fas death factor, *Science* 267 [5203], Seite 1449-56.
- Nagata, S. und Suda, T. (1995): Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations, *Immunol Today* 16 [1], Seite 39-43.
- Neuhaus, O.; Kieseier, B. C. und Hartung, H. P. (2004): Mechanisms of mitoxantrone in multiple sclerosis-what is known?, *J Neurol Sci* 223 [1], Seite 25-7.
- Nicoletti, I.; Migliorati, G.; Pagliacci, M.C. ; Grignani, F. und Riccardi, C. (1991): A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry, *J Immunol Methods* 139 [2], Seite 271-9.
- Nitsch, R.; Bechmann, I.; Deisz, R. A.; Haas, D.; Lehmann, T. N.; Wendling, U. und Zipp, F. (2000): Human brain-cell death induced by tumour-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), *Lancet* 356 [9232], Seite 827-8.
- Noseworthy, J. H. (2003): Management of multiple sclerosis: current trials and future options, *Curr Opin Neurol* 16 [3], Seite 289-97.
- O'Riordan, J. I.; Thompson, A. J.; Kingsley, D. P.; MacManus, D. G.; Kendall, B. E.; Rudge, P.; McDonald, W. I. und Miller, D. H. (1998): The prognostic value of brain MRI in clinically isolated syndromes of the CNS. A 10-year follow-up, *Brain* 121 (Pt 3), Seite 495-503.
- Oritani, K.; Kincade, P. W.; Zhang, C.; Tomiyama, Y. und Matsuzawa, Y. (2001): Type I interferons and limitin: a comparison of structures, receptors, and functions, *Cytokine Growth Factor Rev* 12 [4], Seite 337-48.
- Pan, G.; Ni, J.; Wei, Y. F.; Yu, G.; Gentz, R. und Dixit, V. M. (1997): An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL, *Science* 277 [5327], Seite 815-8.
- Papoff, G.; Cascino, I.; Eramo, A.; Starace, G.; Lynch, D. H. und Ruberti, G. (1996): An N-terminal domain shared by Fas/Apo-1 (CD95) soluble variants prevents cell death in vitro, *J Immunol* 156 [12], Seite 4622-30.
- Pette, M.; Pette, D. F.; Muraro, P. A.; Farnon, E.; Martin, R. und McFarland, H. F. (1997): Interferon-beta interferes with the proliferation but not with the cytokine secretion of myelin basic protein-specific, T-helper type 1 lymphocytes, *Neurology* 49 [2], Seite 385-92.
- Pilling, D.; Akbar, A. N.; Girdlestone, J.; Orteu, C. H.; Borthwick, N. J.; Amft, N.; Scheel-Toellner, D.; Buckley, C. D. und Salmon, M. (1999): Interferon-beta mediates stromal cell rescue of T cells from apoptosis, *Eur J Immunol* 29 [3], Seite 1041-50.
- Pitti, R. M.; Marsters, S. A.; Lawrence, D. A.; Roy, M.; Kischkel, F. C.; Dowd, P.; Huang, A.; Donahue, C. J.; Sherwood, S. W.; Baldwin, D. T.; Godowski, P. J.; Wood, W. I.; Gurney, A. L.; Hillan, K. J.; Cohen, R. L.; Goddard, A. D.; Botstein, D. und Ashkenazi, A. (1998): Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer, *Nature* 396 [6712], Seite 699-703.
- Pitti, R. M.; Marsters, S. A.; Ruppert, S.; Donahue, C. J.; Moore, A. und Ashkenazi, A. (1996): Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family, *J Biol Chem* 271 [22], Seite 12687-90.

- Podack, E. R. (1995): Execution and suicide: cytotoxic lymphocytes enforce Draconian laws through separate molecular pathways, *Curr Opin Immunol* 7 [1], Seite 11-6.
- Poser, C. M.; Paty, D. W.; Scheinberg, L.; McDonald, W. I.; Davis, F. A.; Ebers, G. C.; Johnson, K. P.; Sibley, W. A.; Silberberg, D. H. und Tourtellotte, W. W. (1983): New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols, *Ann Neurol* 13 [3], Seite 227-31.
- Pryse-Phillips, W. und Costello, F. (2001): The epidemiology of multiple sclerosis., Cook, S.D., *Handbook of multiplesclerosis*. 3rd ed. Seite 15-31, Marcel Dekker, New York.
- Qian, D. und Weiss, A. (1997): T cell antigen receptor signal transduction, *Curr Opin Cell Biol* 9 [2], Seite 205-12.
- Rabehi, L.; Irinopoulou, T.; Cholley, B.; Haeffner-Cavaillon, N. und Carreno, M. P. (2001): Gram-positive and gram-negative bacteria do not trigger monocytic cytokine production through similar intracellular pathways, *Infect Immun* 69 [7], Seite 4590-9.
- Rep, M. H.; Schrijver, H. M.; van Lopik, T.; Hintzen, R. Q.; Roos, M. T.; Ader, H. J.; Polman, C. H. und van Lier, R. A. (1999): Interferon (IFN)-beta treatment enhances CD95 and interleukin 10 expression but reduces interferon-gamma producing T cells in MS patients, *J Neuroimmunol* 96 [1], Seite 92-100.
- Rieux-Laucat, F.; Le Deist, F.; Hivroz, C.; Roberts, I. A.; Debatin, K. M.; Fischer, A. und de Villartay, J. P. (1995): Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity, *Science* 268 [5215], Seite 1347-9.
- Roth, W.; Isenmann, S.; Naumann, U.; Kugler, S.; Bahr, M.; Dichgans, J.; Ashkenazi, A. und Weller, M. (1999): Locoregional Apo2L/TRAIL eradicates intracranial human malignant glioma xenografts in athymic mice in the absence of neurotoxicity, *Biochem Biophys Res Commun* 265 [2], Seite 479-83.
- Sabelko-Downes, K. A.; Cross, A. H. und Russell, J. H. (1999): Dual role for Fas ligand in the initiation of and recovery from experimental allergic encephalomyelitis, *J Exp Med* 189 [8], Seite 1195-205.
- Sadovnick, A. D.; Baird, P.A. und Ward, R.H. (1988): Multiple Sclerosis: update risks for relatives., *Am J Med Genet* 29, Seite 533-41.
- Sakaguchi, S. (2000): Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance, *Cell* 101 [5], Seite 455-8.
- Sakai, T.; Inoue, A.; Koh, C. S. und Osame, M. (1999): Serum levels of apoptosis-related molecules in patients with multiple sclerosis and human T-lymphotropic virus Type I-associated myelopathy, *J Interferon Cytokine Res* 19 [9], Seite 999-1004.
- Santiago, B.; Galindo, M.; Palao, G. und Pablos, J. L. (2004): Intracellular regulation of Fas-induced apoptosis in human fibroblasts by extracellular factors and cycloheximide, *J Immunol* 172 [1], Seite 560-6.
- Schmidt, R.M. und Hoffmann, Frank (2002): Multiple Sklerose. Epidemiologie, Diagnostik, Therapie., 3. neubearbeitete und erweiterte Auflage. Auflage, Urban & Fischer, München.
- Schmied, M.; Breitschopf, H.; Gold, R.; Zischler, H.; Rothe, G.; Wekerle, H. und Lassmann, H. (1993): Apoptosis of T lymphocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. Evidence for programmed cell death as a mechanism to control inflammation in the brain, *Am J Pathol* 143 [2], Seite 446-52.
- Sega, S.; Wraber, B. ; Mesec, A. ; Horvat, A. und Ihan, A. (2004): IFN-beta1a and IFN-beta1b have different patterns of influence on cytokines, *Clin Neurol Neurosurg* 106 [3], Seite 255-8.

- Sheridan, J. P.; Marsters, S. A.; Pitti, R. M.; Gurney, A.; Skubatch, M.; Baldwin, D.; Ramakrishnan, L.; Gray, C. L.; Baker, K.; Wood, W. I.; Goddard, A. D.; Godowski, P. und Ashkenazi, A. (1997): Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors, *Science* 277 [5327], Seite 818-21.
- Sicotte, N. L.; Liva, S. M.; Klutch, R.; Pfeiffer, P.; Bouvier, S.; Odesa, S.; Wu, T. C. und Voskuhl, R. R. (2002): Treatment of multiple sclerosis with the pregnancy hormone estriol, *Ann Neurol* 52 [4], Seite 421-8.
- Singer, J.D. und Willett, J.B. (2003): *Applied Longitudinal Data Analysis: Modeling Change and Event Occurrence.*, Oxford Press, New York.
- Smith, K. A.; Gillis, S.; Baker, P. E.; McKenzie, D. und Ruscetti, F. W. (1979): T-cell growth factor-mediated T-cell proliferation, *Ann N Y Acad Sci* 332, Seite 423-32.
- Snell, V.; Clodi, K.; Zhao, S.; Goodwin, R.; Thomas, E. K.; Morris, S. W.; Kadin, M. E.; Cabanillas, F.; Andreeff, M. und Younes, A. (1997): Activity of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in haematological malignancies, *Br J Haematol* 99 [3], Seite 618-24.
- Soldan, S. S.; Alvarez Retuerto, A. I.; Sicotte, N. L. und Voskuhl, R. R. (2003): Immune modulation in multiple sclerosis patients treated with the pregnancy hormone estriol, *J Immunol* 171 [11], Seite 6267-74.
- Song, K.; Chen, Y.; Goke, R.; Wilmen, A.; Seidel, C.; Goke, A. und Hilliard, B. (2000): Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is an inhibitor of autoimmune inflammation and cell cycle progression, *J Exp Med* 191 [7], Seite 1095-104.
- Sommer, N.; Zipp, F.; Rosener, M.; Dichgans, J. und Martin, R. (1996): Influence of genetic factors on multiple sclerosis, *Nervenarzt* 67, Seite 457-64.
- Sorensen, P. S.; Fazekas, F. und Lee, M. (2002): Intravenous immunoglobulin G for the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: a meta-analysis, *Eur J Neurol* 9 [6], Seite 557-63.
- Stark, G. R.; Kerr, I. M.; Williams, B. R.; Silverman, R. H. und Schreiber, R. D. (1998): How cells respond to interferons, *Annu Rev Biochem* 67, Seite 227-64.
- Strasser, A.; O'Connor, L. und Dixit, V. M. (2000): Apoptosis signaling, *Annu Rev Biochem* 69, Seite 217-45.
- Suda, T.; Takahashi, T.; Golstein, P. und Nagata, S. (1993): Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family, *Cell* 75 [6], Seite 1169-78.
- Trapp, B. D.; Peterson, J.; Ransohoff, R. M.; Rudick, R.; Mork, S. und Bo, L. (1998): Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis, *N Engl J Med* 338 [5], Seite 278-85.
- Trapp, B. D.; Ransohoff, R. und Rudick, R. (1999): Axonal pathology in multiple sclerosis: relationship to neurologic disability, *Curr Opin Neurol* 12 [3], Seite 295-302.
- Trauth, B. C.; Klas, C.; Peters, A. M.; Matzku, S.; Moller, P.; Falk, W.; Debatin, K. M. und Krammer, P. H. (1989): Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis, *Science* 245 [4915], Seite 301-5.
- Trump, B. F.; Berezsky, I. K.; Chang, S. H. und Phelps, P. C. (1997): The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis, *Toxicol Pathol* 25 [1], Seite 82-8.
- Vidalain, P. O.; Azocar, O.; Yagita, H.; Rabourdin-Combe, C. und Servet-Delprat, C. (2001): Cytotoxic activity of human dendritic cells is differentially regulated by double-stranded RNA and CD40 ligand, *J Immunol* 167 [7], Seite 3765-72.
- Viglietta, V.; Baecher-Allan, C.; Weiner, H. L. und Hafler, D. A. (2004): Loss of Functional Suppression by CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Patients with

- Multiple Sclerosis, *J Exp Med* 199 [7], Seite 971-9.
- Vukusic, S. und Confavreux, C. (2001): The natural history of multiple sclerosis., Cook, S.D., Handbook of multiple sclerosis. 3rd ed. Seite 433-477, Marcel Dekker, New York.
- Waiczies, S.; Weber, A.; Lunemann, J. D.; Aktas, O.; Zschenderlein, R. und Zipp, F. (2002): Elevated Bcl-X(L) levels correlate with T cell survival in multiple sclerosis, *J Neuroimmunol* 126 [1-2], Seite 213-20.
- Walczak, H.; Bouchon, A.; Stahl, H. und Krammer, P. H. (2000): Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand retains its apoptosis-inducing capacity on Bcl-2- or Bcl-xL-overexpressing chemotherapy-resistant tumor cells, *Cancer Res* 60 [11], Seite 3051-7.
- Walczak, H. und Krammer, P. H. (2000): The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems, *Exp Cell Res* 256 [1], Seite 58-66.
- Walczak, H., Miller, R.E., Ariail, K., Gliniak, B., Griffith, T.S., Kubin, M., Chin, W., Jones, J., Woodward, A., Le, T., Smolak, P., Goodwin, R.G., Rauch, C.T., Schuh, J.C., Lynch, D.H. (1999): Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo., *Nat Med* 5 [2], Seite 157-63.
- Wandinger, K. P.; Lunemann, J. D.; Wengert, O.; Bellmann-Strobl, J.; Aktas, O.; Weber, A.; Grundstrom, E.; Ehrlich, S.; Wernecke, K. D.; Volk, H. D. und Zipp, F. (2003): TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) as a potential response marker for interferon-beta treatment in multiple sclerosis, *Lancet* 361 [9374], Seite 2036-43.
- Wandinger, K. P.; Sturzebecher, C. S.; Bielekova, B.; Detore, G.; Rosenwald, A.; Staudt, L. M.; McFarland, H. F. und Martin, R. (2001): Complex immunomodulatory effects of interferon-beta in multiple sclerosis include the upregulation of T helper 1-associated marker genes, *Ann Neurol* 50 [3], Seite 349-57.
- Wang, J.; Taniuchi, I.; Maekawa, Y.; Howard, M.; Cooper, M. D. und Watanabe, T. (1996): Expression and function of Fas antigen on activated murine B cells, *Eur J Immunol* 26 [1], Seite 92-6.
- Wang, X.; Chen, M.; Wandinger, K. P.; Williams, G. und Dhib-Jalbut, S. (2000): IFN-beta-1b inhibits IL-12 production in peripheral blood mononuclear cells in an IL-10-dependent mechanism: relevance to IFN-beta-1b therapeutic effects in multiple sclerosis, *J Immunol* 165 [1], Seite 548-57.
- Watanabe, D.; Suda, T. und Nagata, S. (1995): Expression of Fas in B cells of the mouse germinal center and Fas-dependent killing of activated B cells, *Int Immunol* 7 [12], Seite 1949-56.
- Weber, A.; Wandinger, K. P.; Mueller, W.; Aktas, O.; Wengert, O.; Grundstrom, E.; Ehrlich, S.; Windemuth, C.; Kuhlmann, T.; Wienker, T.; Bruck, W. und Zipp, F. (2004): Identification and functional characterization of a highly polymorphic region in the human TRAIL promoter in multiple sclerosis, *J Neuroimmunol* 149 [1-2], Seite 195-201.
- Weber, F.; Janovskaja, J.; Polak, T.; Poser, S. und Rieckmann, P. (1999): Effect of interferon beta on human myelin basic protein-specific T-cell lines: comparison of IFNbeta-1a and IFNbeta-1b, *Neurology* 52 [5], Seite 1069-71.
- Weinshenker, B. G. und Ebers, G. C. (1987): The natural history of multiple sclerosis, *Can J Neurol Sci* 14 [3], Seite 255-61.
- Wekerle, H. (1993): T-cell autoimmunity in the central nervous system, *Intervirology* 35 [1-4], Seite 95-100.
- Wendling, U.; Walczak, H.; Dorr, J.; Jaboci, C.; Weller, M.; Krammer, P. H. und Zipp, F. (2000): Expression of TRAIL receptors in human autoreactive and foreign

- antigen- specific T cells, *Cell Death Differ* 7 [7], Seite 637-44.
- Whitaker, J. N. und Mitchell, G. W. (1996): A possible role for altered myelin basic protein in multiple sclerosis, *Ann Neurol* 40 [1], Seite 3-4.
- Wucherpfennig, K. W. (2001): Mechanisms for the induction of autoimmunity by infectious agents, *J Clin Invest* 108 [8], Seite 1097-104.
- Wucherpfennig, K. W. und Strominger, J. L. (1995): Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein, *Cell* 80 [5], Seite 695-705.
- Yong, V. W.; Chabot, S.; Stuve, O. und Williams, G. (1998): Interferon beta in the treatment of multiple sclerosis: mechanisms of action, *Neurology* 51 [3], Seite 682-9.
- Young, T. H.; Lin, D. T. und Chen, L. Y. (2000): Human monocyte adhesion and activation on crystalline polymers with different morphology and wettability in vitro, *J Biomed Mater Res* 50 [4], Seite 490-8.
- Yue, T. L.; Wang, X.; Loudon, C. S.; Gupta, S.; Pillarisetti, K.; Gu, J. L.; Hart, T. K.; Lysko, P. G. und Feuerstein, G. Z. (1997): 2-Methoxyestradiol, an endogenous estrogen metabolite, induces apoptosis in endothelial cells and inhibits angiogenesis: possible role for stress-activated protein kinase signaling pathway and Fas expression, *Mol Pharmacol* 51 [6], Seite 951-62.
- Zamai, L.; Secchiero, P.; Pierpaoli, S.; Bassini, A.; Papa, S.; Alnemri, E. S.; Guidotti, L.; Vitale, M. und Zauli, G. (2000): TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) as a negative regulator of normal human erythropoiesis, *Blood* 95 [12], Seite 3716-24.
- Zang, Y. C.; Kozovska, M. M.; Hong, J.; Li, S.; Mann, S.; Killian, J. M.; Rivera, V. M. und Zhang, J. Z. (1999): Impaired apoptotic deletion of myelin basic protein-reactive T cells in patients with multiple sclerosis, *Eur J Immunol* 29 [5], Seite 1692-700.
- Zhang, J. und Raus, J. (1994): Myelin basic protein-reactive T cells in multiple sclerosis: pathologic relevance and therapeutic targeting, *Cytotechnology* 16 [3], Seite 181-7.
- Zhao, S.; Asgary, Z.; Wang, Y.; Goodwin, R.; Andreeff, M. und Younes, A. (1999): Functional expression of TRAIL by lymphoid and myeloid tumour cells, *Br J Haematol* 106 [3], Seite 827-32.
- Zipp, F. (2000): Apoptosis in multiple sclerosis, *Cell Tissue Res* 301 [1], Seite 163-71.
- Zipp, F.; Beyer, M.; Gelderblom, H.; Wernet, D.; Zschenderlein, R. und Weller, M. (2000a): No induction of apoptosis by IFN-beta in human antigen-specific T cells, *Neurology* 54 [2], Seite 485-7.
- Zipp, F.; Faber, E.; Sommer, N.; Muller, C.; Dichgans, J.; Krammer, P. H.; Martin, R. und Weller, M. (1998a): CD95 expression and CD95-mediated apoptosis of T cells in multiple sclerosis. No differences from normal individuals and no relation to HLA-DR2, *J Neuroimmunol* 81 [1-2], Seite 168-72.
- Zipp, F.; Kerschensteiner, M.; Dornmair, K.; Malotka, J.; Schmidt, S.; Bender, A.; Giegerich, G.; de Waal Malefyt, R.; Wekerle, H. und Hohlfeld, R. (1998b): Diversity of the anti-T-cell receptor immune response and its implications for T-cell vaccination therapy of multiple sclerosis, *Brain* 121 (Pt 8), Seite 1395-407.
- Zipp, F.; Krammer, P. H. und Weller, M. (1999a): Immune (dys)regulation in multiple sclerosis: role of the CD95-CD95 ligand system, *Immunol Today* 20 [12], Seite 550-4. 00001545 00001545.
- Zipp, F.; Martin, R.; Lichtenfels, R.; Roth, W.; Dichgans, J.; Krammer, P. H. und Weller, M. (1997a): Human autoreactive and foreign antigen-specific T cells resist apoptosis induced by soluble recombinant CD95 ligand, *J Immunol* 159

- [5], Seite 2108-15.
- Zipp, F.; Otzelberger, K.; Dichgans, J.; Martin, R. und Weller, M. (1998c): Serum CD95 of relapsing remitting multiple sclerosis patients protects from CD95-mediated apoptosis, *J Neuroimmunol* 86 [2], Seite 151-4.
- Zipp, F.; Sommer, N.; Rosener, M.; Dichgans, J. und Martin, R. (1997b): [Multiple sclerosis. New therapeutic strategies in the experimental stage], *Nervenarzt* 68 [2], Seite 94-101.
- Zipp, F.; Weil, J. G. und Einhaupl, K. M. (1999b): No increase in demyelinating diseases after hepatitis B vaccination, *Nat Med* 5 [9], Seite 964-5.
- Zipp, F.; Weller, M.; Calabresi, P. A.; Frank, J. A.; Bash, C. N.; Dichgans, J.; McFarland, H. F. und Martin, R. (1998d): Increased serum levels of soluble CD95 (APO-1/Fas) in relapsing-remitting multiple sclerosis, *Ann Neurol* 43 [1], Seite 116-20.
- Zipp, F.; Wendling, U.; Beyer, M.; Grieger, U.; Waiczies, S.; Wagenknecht, B.; Haas, J. und Weller, M. (2000b): Dual effect of glucocorticoids on apoptosis of human autoreactive and foreign antigen-specific T cells, *J Neuroimmunol* 110 [1-2], Seite 214-22.

7. Appendix

7.1. Verzeichnis häufig benutzter Abkürzungen

α	anti
Ag	Antigen
AICD	activation-induced cell death (aktivierungsinduzierter Zelltod)
AK	Antikörper
APC	antigen presenting cell (antigenpräsentierende Zelle)
BP	Birkenpollen
CD	cluster of differentiation
CD95L	CD95-Ligand
DcR	decoy receptor (Köderrezeptor)
DD	death domain (Todesdomäne)
DISC	death-inducing signalling complex
DL	detection limit (Nachweisbarkeitsgrenze)
DANN	Desoxyribonukleinsäure
DR	death receptor (Todesrezeptor)
EDSS	expanded disability status score
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
ELISA	enzyme linked immuno adsorbent assay
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorter (Durchflusszytometer)
FADD	Fas-associated death-domain protein
FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)
GA	Glatriamer Acetate
Gld	generalized lymphoproliferative disease
HLA	Humanes Leukozytenantigen
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysacharid
MACS	magnetic cell sorting
MBP	basisches Myelinprotein

MS	Multiple Sklerose
NAB	neutralisierende Antikörper (gegen IFN- β)
PHA	Phytohämagglutinin
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI	Propidiumiodid
PPMS	primär chronisch-progredient verlaufende MS
RNA	Ribonukleinsäure
RRMS	schubförmig remittierend verlaufende MS
RT-PCR	revers transkribierte Polymerasekettenreaktion
SAC	Staphylokokkus aureus Cowman Strain
sCD95	soluble CD95 (lösliches CD95)
SPMS	sekundär chronisch-progredient verlaufende MS
sTRAIL	soluble TRAIL (lösliches TRAIL)
SEM	standarderror of the mean (Standardfehler des Mittelwertes)
SI	Stimulationsindex
SLE	Systemischer Lupus erythematosus
Th	T-Helferzelle
TNF, TNF-R	Tumornekrosefaktor, Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRADD	TNF-receptor-associated death-domain protein
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRAIL-R	TRAIL-Rezeptor
TT	Tetanustoxoid
TCR	T-Zellrezeptor
ZNS	Zentrales Nervensystem

7.2. Danksagung

Hiermit möchte ich allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, recht herzlich danken.

Besonderer Dank gilt Frau Prof. F. Zipp für die freundliche Überlassung des Themas und die hilfreiche Begleitung bei der Anfertigung der Dissertation.

Ebenso danke ich Frau Dr. C. Infante-Duarte für ihre hervorragende fachliche Anleitung und Unterstützung bei den durchflusszytometrischen Untersuchungen. Für die unermüdliche Hilfe in der Zellkultur und bei der Durchführung zahlreicher Experimente danke ich besonders Frau B. Seeger.

Mein Dank gilt auch allen anderen Kolleginnen und Kollegen des Berliner Instituts für Neuroimmunologie. Vor allem Herr Dr. O. Aktas, Frau Dr. S. Waiczies, Herr Dr. J.D. Lünemann, Frau A. Weber und Herr O. Wengert haben durch fruchtbare Diskussionen, wertvolle Hinweise und ein freundliches Arbeitsklima zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Außerdem danke ich Patricia und Tomislav für das Lesen der Arbeit und die vielen Hinweise und Hilfestellungen.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinen Eltern für ihr Verständnis und die jahrelange Unterstützung bedanken.

7.3. Erklärung

Ich, Stefan Ehrlich, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Die Bedeutung löslicher TNF-Familienmitglieder für die Multiple Sklerose“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Inhalte der vorliegenden Arbeit wurden teilweise unter den unten aufgelisteten Titeln veröffentlicht.

Berlin, den 15.9.2005

Stefan Ehrlich

7.4. Publikationen

Luenemann JD, Waiczies S, **Ehrlich S**, Wendling U, Seeger B, Kamradt T, Zipp F. Death ligand TRAIL induces no apoptosis but inhibits activation of human (auto)antigen-specific T cells. *J Immunol.* 2002 May 15; 168(10):4881-8.

Wandinger KP, Lunemann JD, Wengert O, Bellmann-Strobl J, Aktas O, Weber A, Grundstrom E, **Ehrlich S**, Wernecke KD, Volk HD, Zipp F. TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) as a potential response marker for interferon-beta treatment in multiple sclerosis. *Lancet.* 2003 Jun 14;361(9374):2036-43.

Ehrlich S, Infante-Duarte C, Seeger B, Zipp F. Regulation of soluble and surface-bound TRAIL in human T cells, B cells, and monocytes. *Cytokine.* 2003 Dec 21;24(6):244-53.

Weber A, Wandinger KP, Mueller W, Aktas O, Wengert O, **Ehrlich S**, Windemuth C, Kuhlmann T, Wienker T, Bruck W, Zipp F. Identification and functional characterization of a highly polymorphic region in the human TRAIL promoter in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2004 Apr;149(1-2):195-201.

Ehrlich S, Noam GG, Lyoo IK, Kwon BJ, Clark MA, Renshaw PF. Subanalysis of the location of white matter hyperintensities and their association with suicidality in children and youth. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Dec;1008:265-8.

Ehrlich S, Noam GG, Lyoo IK, Kwon BJ, Clark MA, Renshaw PF. White Matter Hyperintensities and their Associations with Suicidality in psychiatrically hospitalized Children and Adolescents. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2004 Jun;43(6):770-6

Ehrlich S, Breeze JL, Heesdorffer DC, Noam GG, Gong X, Alban RL, Davis SE, Renshaw PF. White Matter Hyperintensities and their Associations with Suicidality in psychiatrically hospitalized Young Adults. *J Affect Disord.* 2005 Jun;86(2-3):281-7.

Ehrlich S, Infante-Duarte C, Haas J, Zipp F. No relationship between serum CD95 levels and the suppression of MS during pregnancy. (Manuskript in Revision)